

Potencial antifúngico de algumas plantas utilizadas na medicina tradicional

Alexandra de Pinho Noites Lopes

M  
2017



Potencial antifúngico de algumas plantas utilizadas na medicina tradicional  
Alexandra de Pinho Noites Lopes



Alexandra de Pinho Noites Lopes

## Potencial antifúngico de algumas plantas utilizadas na medicina tradicional

Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre em Medicina Tradicional Chinesa  
submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do  
Porto

Orientadora – Maria João R.F.R. Santos

Categoria – Assistente Convidada

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas

Abel Salazar da Universidade do Porto

Co-orientador – Jorge Pereira Machado

Categoria – Professor Associado

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas

Abel Salazar da Universidade do Porto

Porto Dezembro 2017

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

## **Agradecimentos**

Gostaria de deixar uma palavra de profunda gratidão a todos aqueles que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Para a sua concretização contribuíram várias vontades que, num esforço colectivo, me permitiram chegar ao fim. Sendo assim quero deixar o meu obrigada às seguintes pessoas e instituições:

À minha orientadora, Mestre Maria João Santos e ao meu co-orientador, Professor Doutor Jorge Machado, por todo o apoio, pelo estímulo e entusiasmo revelado por esta dissertação, pelas críticas e sugestões relevantes feitas durante a orientação, pela disponibilidade sempre revelada em todas as fases que levaram à concretização deste projecto.

Ao Professor Doutor Johannes Greten, Director Científico do Mestrado em Medicina Tradicional Chinesa do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, pela sua orientação, pelo saber que transmitiu, pela total colaboração e disponibilidade para solucionar dúvidas e questões.

À Professora Doutora Maria Eugénia Pinto por todas as informações e ensinamentos que me forneceu, pela sua presença, simpatia, dedicação e colaboração, sem ela não teria sido possível fazer este trabalho.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto pela possibilidade da realização deste Mestrado.

Ao Laboratório de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e ao Laboratório de Micologia da Faculdade de Farmácia, ambos da Universidade do Porto, que me acolheram e providenciaram a estrutura e assistência necessárias à realização deste trabalho.

Aos membros dos referidos laboratórios, Bruno, Diana e Cristina, pelo bom acolhimento e pela cooperação ao longo destes meses de trabalho.

Ao Doutor Manuel Montenegro pelo auxílio na obtenção da bibliografia utilizada.

Aos meus amigos que me foram estimulando pela confiança em mim depositada, fazendo-me acreditar que era possível ter sucesso.

Aos meus pais, por tudo o que me proporcionam. O que sou a eles o devo. Nada que escreva pode alguma vez exprimir o quanto lhes sou grata.

## Resumo

**Introdução:** As infecções fúngicas, como as candidíases, representam um importante problema de saúde pública. A elevada incidência global e a prevalência da candidíase podem ser atribuídas ao aumento do uso de antibióticos de largo espectro, de citotóxicos e de corticosteróides, a um crescente número de indivíduos imunosuprimidos assim como aqueles com alterações endócrinas comuns (como a *diabetes mellitus*) ou com severas deficiências nutricionais.

**Objectivos:** O propósito deste estudo é o de investigar se as decocções e os óleos essenciais das sementes de nim (*Azadirachta indica*), de *rhizoma* coptidis (*Coptidis chinensis*), da casca de magnólia (*Magnolia officinalis*) e da escutelária *herbae* (*Scutellaria barbata*) e o óleo essencial de manuka (*Leptospermum scoparium*), têm actividade antifúngica *in vitro* em várias estirpes de *Candida* spp tais como *C. albicans* ATCC® (*American Type Culture Collection strain*®) 10231; *C. glabrata* vaginal de isolado clínico, *C. krusei* ATCC® 6258, *C. parapsilosis* ATCC® 22019 e *C. tropicalis* ATCC® 13803.

**Métodos:** A actividade antifúngica foi estudada através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) pelo micrométodo em caldo para leveduras baseado no documento de referência M27-A3 do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) com ligeiras alterações. A concentração mínima letal (CML) foi então determinada a partir da subcultura das placas de CMI. A formação de hifas em *C. albicans* foi estudada por microscopia de acordo com protocolos já existentes.

**Resultados:** *Coptidis chinensis*: tanto em decocção como em óleo foi a planta com CMI mais baixa. Mais eficiente em *C. krusei* e *C. tropicalis*. Teve na generalidade uma acção fungicida excepto em *C. glabrata*. Não apresentou capacidade de inibição filamentosa significativa.

*Leptospermum scoparium*: apresentou acção fungistática especialmente em *C. glabrata* sendo *C. parapsilosis* a única espécie testada que não teve resultados. Inibiu fortemente a taxa de filamentação até à concentração de CMI/64.

*Azadirachta indica*, *Magnolia officinalis* e *Scutellaria barbata*: não tiveram acção antifúngica nas concentrações testadas.

**Conclusão:** Este estudo revelou que, *in vitro*, a decocção e o óleo essencial de *rhizoma* coptidis e o óleo essencial de manuka apresentam actividade antifúngica em *Candida* spp. As estirpes testadas apresentam uma susceptibilidade diferente devido às suas características distintas, mas os resultados são promissores. A realização de mais ensaios *in vitro* e *in vivo* permitirá obter um maior conhecimento das propriedades

antifúngicas destas plantas assim como, a existência de efeitos sinérgicos entre elas e os antifúngicos convencionais.

**Palavras-chave:** *Candida spp*, actividade antifúngica, medicina tradicional chinesa, *Coptidis chinensis*, *Magnolia officinalis*, *Scutellaria barbata*, *Azadirachta indica*, *Leptospermum scoparium*, óleos essenciais.

## Abstract

**Background:** Fungal infections, such as candidiasis, represent a major important public health problem. The high global incidence and prevalence of candidiasis may be attributed to an increasing usage of broad-spectrum antibiotics, cytotoxic, corticosteroids, and to a growing number of immune-suppressed individuals as well as those with common endocrine disorders (such as *diabetes mellitus*) or severe nutritional deficiencies.

**Objectives:** The purpose of this study is to investigate if decoctions and essential oils of neem seeds (*Azadirachta indica*), *rhizoma coptidis* (*Coptidis chinensis*), magnolia bark (*Magnolia officinalis*) and *scutellaria herbae* (*Scutellaria barbata*) and the essential oil of manuka (*Leptospermum scoparium*), have antifungal activity *in vitro* against several species of *Candida* spp. like *C. albicans* ATCC® (American Type Culture Collection strain®) 10231; *C. glabrata* from a clinical vaginal isolate, *C. krusei* ATCC® 6258, *C. parapsilosis* ATCC® 22019 and *C. tropicalis* ATCC® 13803.

**Methods:** The antifungal activity was studied by the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) with broth microdilution method for yeasts based on the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) reference document M27-A3 with minor modifications. The minimum fungicidal concentration (MFC) was then determined from the subculture of MIC plates. The hyphae formation in *C. albicans* was studied by microscope observation according to already existing protocols.

**Results:** *Coptidis chinensis*: The decoction and the essential oil had the lowest MIC of all plants. More efficient in *C. krusei* and *C. tropicalis*. Generally has a fungicide action except in *C. glabrata*. It did not present significant filamentous inhibition capacity.

*Leptospermum scoparium*: revealed a fungistatic action especially in *C. glabrata* being *C. parapsilosis* the only species tested that had no results. It strongly inhibited the rate of filamentation to a concentration of MIC/64.

*Azadirachta indica*, *Magnolia officinalis* e *Scutellaria barbata*: Had no antifungal action at the concentrations tested.

**Conclusion:** This study revealed that, *in vitro*, the decoction and essential oil of *rhizoma coptidis* and manuka essential oil exhibit antifungal activity in *Candida* spp. The strains tested exhibit a different susceptibility due to their distinct characteristics but the results are promising. Further *in vitro* and *in vivo* assays will provide a better understanding of the antifungal properties of these plants as well as the existence of synergistic effects between them and conventional antifungal agents.

**Keywords:** *Candida* spp, antifungal activity, traditional chinese medicine, *Coptidis chinensis*, *Magnolia officinalis*, *Scutellaria barbata*, *Azadirachta indica*, *Leptospermum scoparium*, essential oils.



## Índice Geral

Agradecimentos .....	III
Resumo .....	V
Abstract .....	VII
Índice Geral .....	VIII
Índice Figuras .....	XII
Índice Tabelas .....	XV
Abreviaturas e símbolos .....	XVI
Capítulo I - Introdução .....	1
1. Perspectiva geral e objectivos.....	2
2. Candidíase .....	3
2.1) Definição .....	3
2.2) Etiologia e epidemiologia.....	3
2.2.1) Candidíase oral .....	5
2.2.2) Candidíase vaginal .....	6
2.2.3) Candidíase cutânea.....	7
2.2.4) Candidíase invasiva.....	10
2.3) Diagnóstico convencional.....	11
2.4) Tratamento convencional .....	15
2.4.1) Polienos.....	16
2.4.2) Azóis .....	17
2.4.3) Equinocandinas.....	18
2.5) Diagnóstico em medicina tradicional chinesa (Escola de Heidelberg) .....	19
2.6) Patofisiologia em medicina tradicional chinesa (Escola de Heidelberg).....	26
2.7) Tratamento em medicina tradicional chinesa (Escola de Heidelberg).....	28
Capítulo II- Materiais e Métodos .....	36
3.1) Reagentes.....	37
3.2) Amostras.....	37
3.2.1) <i>Rhizoma Coptis chinensis</i> .....	37

3.2.1.1. Descrição e características organolépticas .....	38
3.2.1.2. Composição química.....	38
3.2.1.3. Acções farmacológicas .....	39
3.2.1.4. Caracterização chinesa.....	39
3.2.1.5. Indicações terapêuticas .....	40
3.2.1.6. Contra-indicações .....	40
3.2.2) <i>Cortex Magnolia officinalis</i> .....	40
3.2.2.1. Descrição e características organolépticas .....	41
3.2.2.2. Composição química.....	41
3.2.2.3. Acções farmacológicas .....	42
3.2.2.4. Caracterização chinesa.....	42
3.2.2.5. Indicações terapêuticas .....	43
3.2.2.6. Contra-indicações .....	43
3.2.3) <i>Herbae Scutellaria barbata</i> .....	43
3.2.3.1. Descrição e características organolépticas .....	43
3.2.3.2. Composição química.....	44
3.2.3.3. Acções farmacológicas .....	44
3.2.3.4. Caracterização chinesa.....	45
3.2.3.5. Indicações terapêuticas .....	45
3.2.3.6. Contra-indicações .....	46
3.2.4) Sementes de <i>Azadirachta indica</i> .....	46
3.2.4.1. Descrição e características organolépticas .....	46
3.2.4.2. Composição química.....	47
3.2.4.3. Acções farmacológicas .....	48
3.2.4.4. Caracterização chinesa.....	48
3.2.4.5. Indicações terapêuticas .....	49
3.2.4.6. Contra-indicações .....	49
3.2.5) Óleo de partes aéreas de <i>Leptospermum scoparium</i> .....	49
3.2.5.1. Descrição e características organolépticas .....	49

3.2.5.2. Composição química.....	50
3.2.5.3. Acções farmacológicas .....	51
3.2.5.4. Caracterização chinesa.....	51
3.2.5.5. Indicações terapêuticas .....	52
3.2.5.6. Contra-indicações .....	52
3.3) Estirpes utilizadas .....	53
3.3.1) <i>Candida albicans</i> .....	54
3.3.2) <i>Candida glabrata</i> .....	55
3.3.3) <i>Candida krusei</i> .....	57
3.3.4) <i>Candida parapsilosis</i> .....	57
3.3.5) <i>Candida tropicalis</i> .....	58
3.4) Preparação das decocções .....	60
3.5) Ensaio prévio de difusão em placa.....	60
3.6) Avaliação da actividade antifúngica.....	61
3.6.1) Determinação da CMI .....	61
3.6.1.1. Preparação do inóculo .....	61
3.6.1.2. Preparação das soluções de óleos essenciais e das decocções das amostras.....	62
3.6.1.3. Inoculação .....	62
3.6.2) Determinação da CML .....	63
3.7) Estudo do factor de virulência da <i>Candida albicans</i> .....	64
3.7.1) Ensaio da inibição da transição dimórfica .....	64
Capítulo III- Resultados .....	67
4.1) Avaliação da actividade antifúngica.....	68
4.1.1) Ensaio prévio de difusão em placa .....	68
4.1.2) Determinação da CMI e da CML.....	69
4.1.3) Ensaio da inibição dimórfica .....	72
Capítulo IV- Discussão .....	74
Capítulo V- Conclusões e Perspectivas Futuras .....	80

Capítulo VI- Bibliografía .....83

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Exemplo de candidíase oral.....	5
<b>Figura 2.</b> Aspecto geral de uma infecção fúngica genital .....	7
<b>Figuras 3 e 4.</b> Exemplos de candidíases cutâneas .....	8
<b>Figura 5.</b> Exemplo de candidíase cutânea .....	9
<b>Figura 6.</b> Exemplo de candidíase das unhas.....	9
<b>Figura 7.</b> Taxas de incidência de candidemia nos Estados Unidos por 100,000 habitantes por área e período de vigilância.....	10
<b>Figura 8.</b> Imagem microscópica de <i>Candida albicans</i> .....	12
<b>Figura 9.</b> <i>Candida albicans</i> em meio de Sabouraud.....	13
<b>Figura 10.</b> Formação de tubo germinativo (sinalizado com seta azul).....	13
<b>Figura 11.</b> Diferente coloração que as colónias de <i>Candida</i> apresentam no meio de <i>Chromagar Candida</i> e que permite a sua diferenciação .....	14
<b>Figura 12.</b> Exemplo de sistema manual .....	15
<b>Figura 13.</b> Exemplo de sistema automatizado.....	15
<b>Figura 14.</b> Estrutura química da anfotericina B.....	16
<b>Figura 15.</b> Estrutura química do fluconazol .....	18
<b>Figura 16.</b> Estrutura química do voriconazol .....	18
<b>Figura 17.</b> Estrutura química da caspofungina .....	18
<b>Figura 18.</b> A curva sinusoidal das fases <i>yang</i> e <i>yin</i> .....	20
<b>Figura 19.</b> Estádios do ALT.....	25
<b>Figura 20.</b> Possíveis reacções provocadas pelo agente <i>ventus</i> do ponto de vista ocidental .....	26
<b>Figura 21.</b> Representação dos <i>sapores</i> no modelo da curva sinusoidal.....	30
<b>Figura 22.</b> Classificação dos fitofármacos de acordo com a sua temperatura .....	30
<b>Figura 23.</b> Tipos de tendência funcional de um fármaco .....	31
<b>Figura 24.</b> Principais grupos da farmacologia chinesa .....	34
<b>Figuras 25 e 26.</b> (A) Planta completa e (B) rizoma seco de <i>C. chinensis</i> .....	38
<b>Figura 27.</b> Estrutura química da berberina .....	39

<b>Figura 28.</b> Partes aéreas <i>Magnolia officinalis</i> .....	41
<b>Figura 29.</b> Cascas de <i>Magnolia officinalis</i> .....	41
<b>Figura 30.</b> Estruturas químicas magnolol e honokiol .....	42
<b>Figura 31.</b> Partes aéreas frescas de <i>Scutellaria barbata</i> .....	44
<b>Figura 32.</b> Partes aéreas secas de <i>Scutellaria barbata</i> .....	44
<b>Figura 33.</b> Estrutura química da escutelarina .....	44
<b>Figura 34.</b> Estrutura química da luteolina .....	44
<b>Figura 35.</b> Estrutura química da apigenina .....	44
<b>Figura 36.</b> Árvore de <i>Azadirachta indica</i> .....	47
<b>Figura 37.</b> Frutos de <i>Azadirachta indica</i> .....	47
<b>Figura 38.</b> Sementes de <i>Azadirachta indica</i> .....	47
<b>Figura 39.</b> Estrutura química da azadiractina .....	47
<b>Figura 40.</b> Árvore de <i>Leptospermum scoparium</i> .....	50
<b>Figura 41.</b> Flores de <i>Leptospermum scoparium</i> .....	50
<b>Figura 42.</b> Estrutura química da leptospermona .....	51
<b>Figura 43.</b> Cascas de <i>Magnolia officinalis</i> .....	53
<b>Figura 44.</b> Sementes de <i>Azadirachta indica</i> .....	53
<b>Figura 45.</b> Rizomas de <i>Coptis chinensis</i> .....	53
<b>Figura 46.</b> Partes aéreas de <i>Scutellaria barbata</i> .....	53
<b>Figura 47.</b> Óleos essenciais de <i>Coptis chinensis</i> , <i>Leptospermum scoparium</i> , <i>Azadirachta indica</i> , <i>Magnolia officinalis</i> e <i>Scutellaria barbata</i> utilizados .....	53
<b>Figura 48.</b> Colónias de <i>C. albicans</i> destacadas em fundo escuro .....	55
<b>Figura 49.</b> Formação de tubo germinativo e hifas .....	55
<b>Figura 50.</b> Detecção de <i>C. albicans</i> em CHROMAgar® .....	55
<b>Figura 51.</b> Imagem microscópica de <i>C. glabrata</i> .....	56
<b>Figura 52.</b> Detecção de <i>C. glabrata</i> em CHROMAgar® .....	56
<b>Figura 53.</b> Imagem microscópica de <i>C. krusei</i> .....	57
<b>Figura 54.</b> Detecção de <i>C. krusei</i> em CHROMAgar® .....	57
<b>Figuras 55 e 56.</b> Aspecto típico de colónias de <i>C. parapsilosis</i> .....	58

<b>Figura 57.</b> Detecção de <i>C. parapsilosis</i> em CHROMAgar® .....	58
<b>Figura 58.</b> Imagem de microscopia de <i>C. tropicalis</i> .....	59
<b>Figura 59.</b> Detecção de <i>C. tropicalis</i> em CHROMAgar® .....	59
<b>Figura 60.</b> Subcultura de 24h em Sabouraud das estirpes de <i>Candida</i> spp. testadas .....	59
<b>Figura 61.</b> Fervura durante a preparação da decocção de cascas de <i>Magnolia officinalis</i> .....	60
<b>Figura 62.</b> Arrefecimento das decocções de <i>Coptidis chinensis</i> e <i>Azadirachta indica</i> antes da filtração .....	60
<b>Figura 63.</b> Exemplo de microplaca de 96 poços para realização de ensaios para determinação de CMI .....	63
<b>Figura 64.</b> Fluxograma do procedimento de determinação da CMI .....	63
<b>Figura 65.</b> Exemplo de determinação da CML na decocção e no óleo de coptidis com <i>Candida krusei</i> .....	64
<b>Figura 66.</b> Fluxograma do procedimento do ensaio da inibição da transição dimórfica ...	66
<b>Figura 67.</b> Ensaio em placa das decocções de coptidis, magnólia e nim .....	68
<b>Figura 68.</b> Ensaio em placa da decocção e óleo de escutelária .....	68
<b>Figura 69.</b> Ensaio em placa do óleo de coptidis .....	69
<b>Figura 70.</b> Ensaio em placa dos óleos de manuka e nim .....	69
<b>Figura 71.</b> Ensaio em placa do óleo de magnólia .....	69
<b>Figura 72.</b> Inibição da formação de tubos germinativos em <i>Candida albicans</i> ATCC® 10231 tratada com óleo essencial de coptidis. Resultados apresentados em valor absoluto médio ( $\pm$ desvio padrão) de tubos germinativos por 100 células em 4 ensaios..	72
<b>Figura 73.</b> Inibição da formação de tubos germinativos em <i>Candida albicans</i> ATCC® 10231 tratada com decocção de coptidis. Resultados apresentados em valor absoluto médio ( $\pm$ desvio padrão) de tubos germinativos por 100 células em 4 ensaios .....	73
<b>Figura 74.</b> Inibição da formação de tubos germinativos em <i>Candida albicans</i> ATCC® 10231 tratada com óleo essencial de manuka. Resultados apresentados em valor absoluto médio ( $\pm$ desvio padrão) de tubos germinativos por 100 células em 4 ensaios..	73

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Os diferentes significados de <i>yin</i> e <i>yang</i> .....	<b>20</b>
<b>Tabela 2.</b> Actividade antifúngica das amostras testadas em relação às estirpes de <i>Candida spp.</i> CMI e CML determinadas por micrométodo e expressas em $\mu\text{L/mL}$ .....	<b>71</b>



## **Abreviaturas e Símbolos**

ALT - Algor Laedens Theory  
APT - Água peptonada tamponada  
ATCC - American Type Culture Collection Strain  
CLSI - Clinical and Laboratory Standard Institute  
CMI - Concentração mínima inibitória  
CML - Concentração mínima letal  
DIU - Dispositivo intrauterino  
DMSO - Dimetilsulfóxido  
EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing  
MFC - Minimum fungicidal concentration  
MIC - Minimum inhibitory concentration  
MTC - Medicina tradicional chinesa  
MOPS - Ácido 3-[N-morfolino] propano-sulfônico  
NaCl - Cloreto de sódio  
NaOH - Hidróxido de sódio  
NYP - N-acetilglucosamina, Base azotada para leveduras, Prolina  
PAS - Ácido periódico-Schiff  
RPMI - Roswell Park Memorial Institute  
SDA - Sabouraud dextrose agar  
UFC - Unidades formadoras de colônias  
VIH - Virus imunodeficiência humana

---

## **I. Introdução**

---

## 1. Perspectiva geral e objetivos

A globalização, a expansão do comércio internacional de produtos alimentares, biológicos e medicinais, as mudanças sociais e ambientais ligadas à urbanização e a desflorestação são manifestações da natureza rapidamente mutável do mundo em que hoje vivemos. Adicionando esses factores à adaptação dos microrganismos, ocorreu o regresso de doenças antigas e a emergência de novas e a evolução da resistência antimicrobiana, o que significa que os tratamentos para infecções virais, bacterianas e fúngicas tornaram-se menos eficazes.

Em relação às patologias de origem fúngica, nomeadamente as causadas por agentes leveduriformes como as candidíases, tem-se verificado que a resistência aos fármacos aumentou significativamente nas últimas décadas. As infecções por leveduras tornaram-se importantes causas de morbilidade e mortalidade especialmente em doentes imunocomprometidos, com implicações importantes nos custos com a saúde. Uma consequência inevitável do uso crescente de antifúngicos nos últimos anos foi o aumento do número e da variedade da resistência fúngica. Considerando a emergente resistência multi-fármaco, uma atenção substancial focou-se nos produtos naturais com propriedades antifúngicas, estimulando a procura de terapêuticas alternativas (Lopes, Pinto et al. 2013).

Nos últimos anos, o uso de compostos naturais em sinergia com antifúngicos convencionais tem também despertado muita atenção no campo da investigação. Um composto natural com elevada eficácia e menos efeitos secundários é desejável como substituto para tratamentos químicos que têm variados efeitos adversos (Himratul-Aznita, Nor-Zulaila et al. 2016).

As estimativas mais conservadoras referem que só 15% das plantas foram avaliadas do ponto de vista fitoquímico e só 6% investigadas em relação à actividade biológica. Estes dados mostram que há um enorme potencial não explorado para novos medicamentos, mas com o crescimento industrial e com a urbanização, muitas dessas espécies podem-se perder nos próximos anos, frequentemente sem terem as suas propriedades medicinais reconhecidas (Leach 2011).

Este trabalho pretende ser um pequeno passo num maior conhecimento *in vitro* de algumas plantas utilizadas tradicionalmente como antissépticos, antimicrobianos e

---

antifúngicos e que poderão, com mais estudos e ensaios, vir a ser alternativas ou adjuvantes no tratamento das candidíases.

## 2. Candidíase

### 2.1) Definição

A candidíase ou candidose é uma micose causada por leveduras do género *Candida*, em que a lesão pode ser aguda ou crónica, superficial ou profunda, e de espectro clínico variável (Barbedo and Sgarbi 2010, Khodavandi, Tahzir et al. 2013).

### 2.2) Etiologia e Epidemiologia

Embora se diga que os agentes da candidíase sejam as diversas espécies do género *Candida*, sobressaindo como a mais importante a *Candida albicans*, não se pode deixar de acrescentar que as verdadeiras causas de infecção são os numerosos factores inerentes ao próprio paciente e outros, paradoxalmente, decorrentes do progresso da medicina (Oliveira 2014). A elevada incidência global e prevalência das candidíases pode ser atribuída ao aumento do uso de antibióticos de largo espectro, dos citotóxicos, dos corticosteróides e a um número crescente de indivíduos imunocomprometidos assim como, portadores de doenças endócrinas (como a *diabetes mellitus*) ou de deficiências nutricionais severas (Himratul-Aznita, Nor-Zulaila et al. 2016).

As infecções por *Candida* envolvem um espectro amplo de doenças superficiais e invasivas oportunistas, que ocorrem em pacientes expostos a uma grande diversidade de factores de risco. Os sintomas e as áreas do organismo afectadas são diversas: infecções cutâneas e das mucosas podem ser documentadas em pacientes saudáveis, mas com pequenas alterações locais de resposta do hospedeiro no sítio da infecção. Por outro lado, infecções sistémicas por *Candida* podem comprometer órgãos internos como resultado de disseminação sanguínea, complicações infecciosas geralmente documentadas em pacientes imunocomprometidos, com doenças degenerativas e/ou neoplásicas, ou indivíduos saudáveis portadores de dispositivos médicos, com taxas de mortalidade que podem chegar aos 47% (Barbedo and Sgarbi 2010, Winter, Salcedo et al. 2016).

---

Espécies de *Candida* são encontradas no tubo gastro-intestinal em 80% da população adulta saudável. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização por *Candida* vaginal e a nível hospitalar, o género *Candida* corresponde a cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas, representando um grande desafio para os clínicos de diferentes especialidades devido às dificuldades de diagnóstico e terapêutica das infecções causadas por tais agentes. Quando há uma ruptura no balanço normal da microbiota ou o sistema imunitário do hospedeiro encontra-se comprometido, as espécies do género *Candida* tendem a manifestações agressivas, tornando-se patogénicas (Barbedo and Sgarbi 2010).

Apesar da sua crescente importância, muitas infecções fúngicas têm sido negligenciadas mundialmente até recentemente. Há uma falta de conhecimento da sua epidemiologia porque não são de declaração obrigatória (Sabino, Verissimo et al. 2017).

Na última década, as infecções por *Candida* tornaram-se a oitava causa de infecções invasivas na Europa. Nos países em vias de desenvolvimento constata-se uma maior prevalência de infecções candidiásicas, devido aos recursos hospitalares deficitários e ao desconhecimento da patologia. Nos países desenvolvidos têm aumentado os casos de candidíase oral e diminuído os casos de candidíase invasiva (Rocha, Cardoso et al. 2011).

A maioria dos estudos mostra que *C. albicans* constitui 60% dos isolados de amostras clínicas (Barbedo and Sgarbi 2010). Uma vez que esta levedura faz parte da microbiota humana, colonizando muitas regiões do organismo incluindo o tracto gastro-intestinal, o tracto geniturinário, o aparelho respiratório, a cavidade oral e a pele dos indivíduos saudáveis, é considerada uma micose oportunista (Oliveira 2014, Winter, Salcedo et al. 2016). No entanto frequentemente encontramos outros agentes de candidíase, como por exemplo: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. viswanathii*, *C. famata*, entre outras, sendo que todas estas espécies têm sido isoladas de casos clínicos (Barbedo and Sgarbi 2010). Em Portugal, um estudo realizado entre 2003 e 2006 onde todas as espécies causadoras de candidíases num centro hospitalar foram analisadas, *C. albicans* foi detectada em 69,6% das infecções por leveduras e as *Candida* não *albicans* foram responsáveis por 28,3% destas patologias. Destas últimas as espécies foram por ordem decrescente *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (Paulo, Mourao et al. 2009). Algumas dessas espécies *Candida* não *albicans* estão-se a tornar rapidamente resistentes aos

---

antifúngicos de primeira e segunda linha como o fluconazol e as equinocandinas (Goel, Rohilla et al. 2016).

### 2.2.1) Candidíase oral

Desde o nascimento, a cavidade oral é colonizada por leveduras do género *Candida*, principalmente *C. albicans*. Geralmente esses fungos habitam a mucosa bucal como leveduras saprófitas, constituindo parte da microbiota normal. Porém, sob determinadas condições, podem assumir a forma patogénica invasiva filamentososa, induzindo o aparecimento de lesões que são frequentes em crianças ou pacientes imunodeprimidos (Barbedo and Sgarbi 2010).

A forma de pseudomembrana (conhecida em Portugal com a denominação popular de “sapinho”) é a apresentação mais conhecida, caracterizada por uma pseudomembrana de coloração do branco ao creme que, quando removida, apresenta fundo avermelhado. No entanto, outras formas clínicas como a eritematosa e a queilite angular associadas à *Candida*, são também frequentes na actualidade (Ferreira and Sousa 2000, Barbedo and Sgarbi 2010).



**Figura 1.** Exemplo de candidíase oral (adaptado de <http://www.mdsaude.com>).

A candidíase oral pode ser causada por diferentes espécies do género *Candida*, entre elas *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. inconspicua*, *C. guilliermondii*, entre outras (Barbedo and Sgarbi 2010).

A candidíase oral não é uma patologia mortal, mesmo que, ao provocar danos de diferentes níveis, comprometa o paladar e a deglutição, levando a uma diminuição do apetite, principalmente nos casos de pacientes VIH-positivos ou pacientes hospitalizados e idosos. A candidíase oral, nesses casos, pode ser a porta de entrada para

---

complicações da candidíase do tipo orofaríngeas, esofágicas, laringeas e sistémicas. Considera-se que até 90% dos indivíduos infectados pelo VIH sofrerão pelo menos um episódio de candidíase orofaríngea (Ferreira and Sousa 2000, Barbedo and Sgarbi 2010, Sabino, Verissimo et al. 2017).

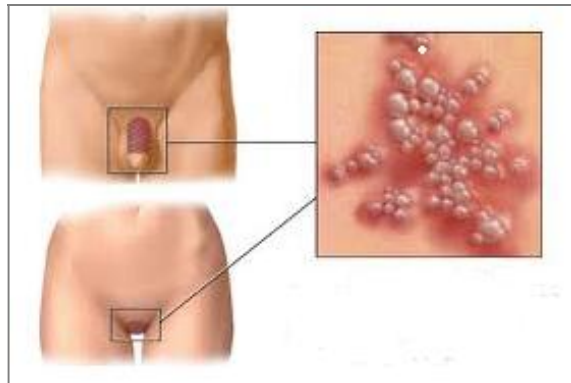
Nos Estados Unidos está estimado que entre 5 a 7% dos recém-nascidos com menos de um mês desenvolvam candidíase oral. A prevalência entre pacientes VIH positivos está calculada entre 9 e 31%, e estudos reportaram 20% de incidência desta patologia em doentes oncológicos (CDC 2014). Em Portugal, não foram encontrados registos oficiais ou estudos acerca da prevalência da candidíase oral em pacientes com cancro nem em transplantados nem o número de pacientes que usam próteses dentárias, uma vez que estas são outras condições habitualmente associadas a este tipo de candidíase. O mesmo se aplica ao número de pacientes com *diabetes mellitus* (Sabino, Verissimo et al. 2017).

### **2.2.2) Candidíase vaginal**

A segunda infecção fúngica mais comum em Portugal é a candidíase vulvovaginal recorrente, com um número de 150,700 mulheres (entre os 15-50 anos de idade) afectadas por ano, que traduz uma incidência de 2854 casos por cada 100,000 mulheres. Essa incidência é similar a outros estudos europeus (Sabino, Verissimo et al. 2017). Nos Estados Unidos, estima-se que cerca de 75% de mulheres em idade adulta tenham pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal por ano (CDC 2014).

*C. albicans* é a mais importante espécie de levedura encontrada no tracto genital feminino. Cerca de 20 a 25% das mulheres saudáveis e assintomáticas são positivas para culturas de *C. albicans*. *C. glabrata* surge em 5 a 15% dos casos de candidíases vulvovaginais sendo a segunda espécie mais frequente. Outras espécies detectadas em infecções ginecológicas com menos frequência são *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis* e *C. krusei*. Durante os últimos anos, tem-se vindo a observar um aumento da detecção de espécies não *albicans* numa maior taxa de recorrências dos episódios vulvovaginais, e isto deve-se à generalização de terapias inadequadas. A erradicação de *C. albicans* pode causar uma selecção de espécies, como *C. glabrata*, resistentes a diferentes agentes de uso comum (Barbedo and Sgarbi 2010).

Os sintomas das candidíases vaginais são, além da leucorreia, o prurido, a disúria, ardência, inflamação dos lábios vaginais e dispareunia. No exame local, podem ser observadas placas esbranquiçadas, vesículo-pústulas, podendo mesmo haver ulceração, tudo dependendo da gravidade do caso. No homem, a *Candida* provoca a balanite, que deve ser pesquisada, porque é uma das fontes de infecção para a mulher (Oliveira 2014).



**Figura 2.** Aspecto geral de uma infecção fúngica genital (adaptado de <http://www.doctortipster.com>).

A actividade sexual (traumas de mucosa), o uso de diferentes tipos de protecção menstrual e substâncias de higiene íntima, o uso contínuo de roupas apertadas, de peças íntimas de tecidos sintéticos, a gravidez, os anticoncepcionais orais e o dispositivo intrauterino (DIU), entre outros, são alguns dos factores predisponentes para esta patologia. A recorrência na candidíase vulvovaginal também surge como infecção secundária noutras enfermidades, como *diabetes mellitus*, imunodepressão, terapia hormonal exógena e VIH (Barbedo and Sgarbi 2010).

### 2.2.3) Candidíase cutânea

Uma variedade de factores locais e sistémicos predispõe a infecções fúngicas superficiais. A candidíase cutânea frequentemente ocorre quando há condições de humidade e temperatura elevadas, como nas dobras da pele, na zona da fralda em recém-nascidos, e em climas tropicais ou durante os meses de Verão. A *diabetes mellitus* e o VIH também estão associados a candidíases cutâneas (Barbedo and Sgarbi 2010).



---

A candidíase cutânea aguda pode-se apresentar de diferentes formas:

- intertrigo (localizado nas dobras da pele como axilas, virilha, sulco interglúteo, prega submamária, e em pessoas obesas na prega suprapúbica) produzindo intenso eritema, edema, exsudado purulento e pústulas;
- erosão interdigital;
- foliculite (infecção do folículo piloso, principalmente em pacientes com VIH);
- onicomicose (estriação progressiva, discromia e opacificação da lâmina ungueal que se acaba por tornar friável) e perioníquia (inflamação, mais ou menos dolorosa, da pele periférica ungueal, que se apresenta vermelha e brilhante) (Ferreira and Sousa 2000, Barbedo and Sgarbi 2010).

Em relação a candidíases cutâneas, os dados estatísticos são muito poucos. Salienta-se um estudo, já mencionado, realizado durante 4 anos num centro hospitalar onde 30 casos de infecção fúngica cutânea foram analisados e *C. albicans* foi o agente etiológico em 23 deles seguida de *C. parapsilosis* com 4 casos (Paulo, Mourao et al. 2009).

Em alguns casos, infecções superficiais podem-se tornar severas e de difícil tratamento, produzindo raramente uma desordem conhecida como candidíase mucocutânea crónica, condição caracterizada sobretudo pela deficiência imunitária celular, situação que consiste em persistentes e recorrentes infecções de membranas mucosas, couro cabeludo, pele e unhas, com uma variedade de manifestações. A candidíase mucocutânea crónica também está associada a endocrinopatias e fenómenos auto-imunes, como o hipoparatiroidismo, hipotiroidismo e anemia hemolítica auto-imune (Ferreira and Sousa 2000, Barbedo and Sgarbi 2010)





**Figuras 3, 4, 5 e 6.** Exemplos de candidíase cutânea e de candidíase nas unhas (adaptado de <http://www.medicinanet.com.br>).

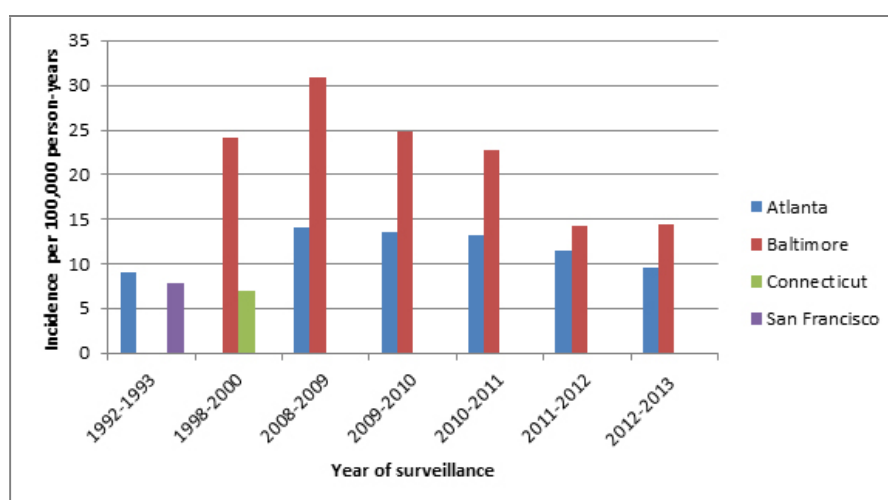
As leveduras do género *Candida* são habitualmente encontradas nas unhas. *Candida albicans* é o agente patogénico mais comum. *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* são encontradas com menor frequência. As leveduras do género *Candida* podem-se comportar como patogénios primários, invadindo a unha normal, principalmente em pacientes com candidíase mucocutânea crónica e imunodeprimidos. Já em pacientes imunocompetentes, com frequência são patogénios secundários, invadindo a unha previamente alterada por trauma, hiper-hidratação ou irritação por contacto com substâncias químicas. Podem também actuar como patogénios secundários em unhas acometidas por psoríase e líquen plano e por outras dermatoses (Barbedo and Sgarbi 2010).

A candidíase cutânea congénita, por espécies do género *Candida*, surge nos primeiros dias de vida do recém-nascido. Entre as principais lesões na pele, destacam-se: erupções generalizadas, extensas regiões eritematosas, vesículas, pápulas e pústulas (lesões de morfologias variadas que representam diferentes estágios de evolução, e que podem coexistir). Na maioria dos casos, quase toda extensão do recém-nascido apresenta lesões; porém, regiões como as costas, extremidades (palmas das mãos e solas dos pés) e dobras da pele são as áreas mais afectadas. O principal factor que gera a candidíase cutânea congénita é a candidíase vulvovaginal na mulher durante a gravidez. A candidíase cutânea congénita pode evoluir para uma forma disseminada, forma esta que gera mortalidade elevada em recém-nascidos (Barbedo and Sgarbi 2010).

#### 2.2.4) Candidíase invasiva

Existem várias evidências e trabalhos que sugerem que a infecção da corrente sanguínea por *Candida* é um grande problema na maioria dos hospitais em todo o mundo. A candidemia é observada particularmente entre pacientes hospitalizados por longos períodos que são expostos a antibióticos, terapias imunodepressivas, nutrição parenteral e procedimentos invasivos múltiplos. A fungemia por *Candida* é geralmente difícil de diagnosticar, o tratamento é de alto custo e existe uma alta taxa de mortalidade. Entre as manifestações clínicas, a febre é a mais comum; porém, as infecções podem tomar diversas formas e localizações (septicemia, pneumonia, endocardite, artrite, osteomielite, miosite, peritonite, meningite, entre outras).

Há variações geográficas significativas no padrão etiológico de infecções invasivas por *Candida* spp. documentadas em diferentes países. Enquanto na América do Norte se nota o predomínio de *C. glabrata* entre as espécies não *albicans*, na América do Sul observa-se predomínio de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Nos últimos 10 anos, alguns estudos têm reportado uma mudança na etiologia das candidemias. Enquanto *C. albicans* é ainda considerada a espécie mais comum causadora de candidemias, o aumento das taxas de candidemia por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* é mencionado em todo o mundo. *C. parapsilosis* é responsável por candidemias não *albicans* mais frequentes em uso de cateteres e nutrição parenteral, *C. tropicalis* está mais associada a doentes oncológicos e a pacientes neutropênicos, e *C. krusei* e *C. glabrata* estão mais associadas à prévia exposição a azóis (Barbedo and Sgarbi 2010).



**Figura 7.** Taxas de incidência de candidemia nos Estados Unidos por 100,000 habitantes por área e período de vigilância (adaptado de <https://www.cdc.gov>).

---

Nas infecções sanguíneas disseminadas, *Candida* está em 4º lugar nos Estados Unidos e 7º na Europa (Winter, Salcedo et al. 2016). Nos Estados Unidos, estimam-se 46000 casos anuais de candidemia e uma prevalência de 10 a 14 casos em 100,000 habitantes. Até 95% de todas as infecções invasivas por *Candida* são provocadas por 5 espécies de *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, e *C. krusei*. Apesar de *C. albicans* ser a espécie mais comum tem diminuído nos últimos 20 anos. As espécies não *albicans* causam agora cerca de 2/3 dos casos de candidemia nos Estados Unidos sendo *C. glabrata*, como já foi mencionado, a mais identificada (CDC 2014).

Em Portugal, a candidemia afecta 2,19 por 100,000 habitantes baseado em 240 episódios. Apesar da falta de estudos no nosso país, os valores encontrados são semelhantes aos dos países do Norte da Europa como a Noruega e a Finlândia. Num estudo multicêntrico, quinze diferentes espécies de *Candida* foram encontrados, com *C. albicans* a ser mais prevalente (40%) seguida por *C. parapsilosis* (23%) e *C. glabrata* (13%) (Sabino, Verissimo et al. 2017).

### **2.3) Diagnóstico convencional**

A anamnese é o primeiro passo para o diagnóstico seguido do exame físico do paciente. Tendo em conta a área do organismo que se encontra afectada, a gravidade da sintomatologia e o interesse em identificar qual o agente específico envolvido, deve-se proceder ao estudo das características morfológicas, fisiológicas, e no caso das leveduras patogénicas humanas, dos caracteres serológicos e patológicos (Ferreira and Sousa 2000).

O tipo e a qualidade da amostra biológica, submetida ao laboratório de micologia, são factores importantes no sucesso do isolamento e na identificação do agente etiológico. A assépsia antes da colheita e a quantidade da amostra são condições básicas para o sucesso do diagnóstico fúngico por leveduras do género *Candida* (Barbedo and Sgarbi 2010).

Os procedimentos para a colheita de amostras são estabelecidos de acordo com a sintomatologia clínica. Como exemplo, temos os fragmentos de pele e unhas, as raspagens efectuadas nas mucosas oral, vaginal ou anal, a colheita da secreção do tracto respiratório, do sangue, do líquido, da urina, das fezes, entre outros. Independentemente da amostra, lesões com suspeita de leveduras do género *Candida*

---

devem seguir as etapas descritas a seguir; porém, alguns laboratórios de micologia não fazem por rotina a identificação da espécie, limitando-se apenas ao género (Barbedo and Sgarbi 2010).

**Exame directo:** é usado para pele, unha, tecidos obtidos por biópsia, exsudados espessos e outros materiais densos. O exame é feito ao microscópio, com uma ampliação de 40x. O exame directo visa a observação de blastoconídios e pseudo-hifas. Em alguns casos, dependendo da amostra, podem-se usar as colorações de Gram, Giemsa, PAS, entre outras (Barbedo and Sgarbi 2010, Oliveira 2014).



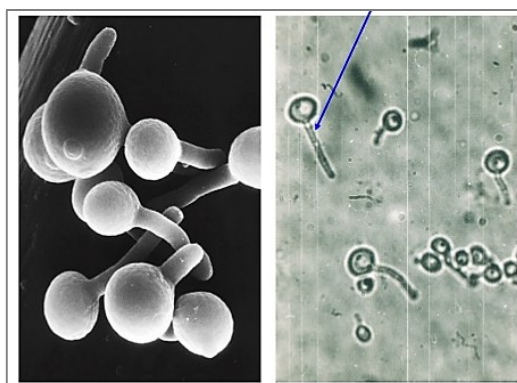
**Figura 8.** Imagem microscópica de *Candida albicans* (adaptado de <http://medsimples.com>).

**Cultura em meio de Sabouraud:** a amostra biológica, para além do processamento para evidênciação pelo exame directo, deverá ser utilizada para isolamento do agente etiológico e observação da macromorfologia. Para isso, deverá ser semeada sobre a superfície do meio de cultura sólido, podendo ser em tubos ou placas de Petri. As espécies do género *Candida* tendem a apresentar coloração branca ou creme, em colónias leveduriformes homogéneas de textura cremosa e superfície lisa (Ferreira and Sousa 2000, Barbedo and Sgarbi 2010).



**Figura 9.** *Candida albicans* em meio de Sabouraud (adaptado de <http://yeastinfectioncause.net>).

**Teste da formação do tubo germinativo:** este teste é um dos testes mais utilizados na identificação de *C. albicans*. A partir de uma parte da amostra, é feita uma suspensão em tubo de ensaio contendo soro humano ou animal que se incuba a 37°C durante um período máximo de 2 a 3 horas. Este prazo é importante porque, após esse período, outras espécies de *Candida*, além de *C. albicans*, formam também tubo germinativo. Depois deve-se examinar ao microscópio óptico com objectiva de 40x. A presença de tubo germinativo, na forma de pequeno filamento que surge do blastoconídio, sem formar constrição com a célula-mãe, permite a identificação presuntiva de *C. albicans* (Ferreira and Sousa 2000, Barbedo and Sgarbi 2010, Campos, de Oliveira et al. 2016).



**Figura 10.** Formação de tubo germinativo (sinalizado com seta azul) (adaptado de <http://yeastinfectioncause.net>).

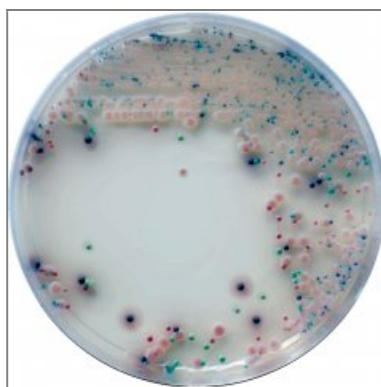
**Formação de pseudo-hifas, hifas e clamidósporos:** possibilita o estudo micromorfológico das leveduras em meios pobres à base de milho de batata, cenoura e bÍlis. A técnica baseia-se no princípio de que a incubação neste tipo de meios estimula a produção de conídios e a filamentação. A presença de pseudo-hifas e hifas hialinas,



---

septadas e ramificadas é característica do género *Candida*, e se houver formação de clamidósporos, indica *C. albicans* (Ferreira and Sousa 2000, Barbedo and Sgarbi 2010).

**Chromagar Candida®:** meio de isolamento cromogénico que possibilita a identificação presuntiva das espécies do género *Candida*, como também facilita o reconhecimento de culturas mistas. O seu princípio é a produção de cor nas colónias, por reacções enzimáticas específicas, com um substrato cromogénico do meio. *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* geram, respectivamente, colónias de coloração verde, azul e rosa rugosa, e as demais, coloração branca a rosa (Barbedo and Sgarbi 2010).



**Figura 11.** Diferente coloração que as colónias de *Candida* apresentam no meio de *Chromagar Candida®* e que permite a sua diferenciação (adaptado de <http://www.chromagar.com>).

**Provas bioquímicas:** são divididas em assimilação (auxanograma) e fermentação (zimograma). No auxanograma, diferentes fontes de carbono e de azoto são dispostas em alíquotas sobre a placa de Petri onde a levedura foi semeada previamente. Após incubação à temperatura ambiente ou 25°C, durante uma semana, a levedura irá assimilar e crescer ou não à volta de determinadas fontes, de acordo com o metabolismo característico da sua espécie. A leitura é feita pelo halo de turvação resultante do crescimento, e indica prova de assimilação positiva para a respectiva fonte. Para o zimograma, diversas fontes de hidratos de carbono são colocadas em tubos, contendo meio básico líquido. A levedura é semeada em cada tubo e após um período de até 15 dias a 25°C, a fermentação é revelada por formação de bolhas de gás, observadas dentro de tubos de Durham, colocados previamente durante a preparação do meio básico. Os resultados do auxanograma e do zimograma são comparados a tabelas existentes na bibliografia, sendo que as diferentes espécies possuem distintos perfis de assimilação e fermentação (Barbedo and Sgarbi 2010).

**Galerias de identificação rápida:** baseiam-se, essencialmente, em provas de assimilação de hidratos de carbono; porém, os fabricantes em geral, recomendam a realização de provas adicionais, como análise macro e micromorfológica. Os sistemas manuais mais conhecidos são o API 20 AUX®, o ID 32C®, e o AUXACOLOR®. Esses sistemas consistem em galerias plásticas contendo microcúpulas com hidratos de carbono desidratados, onde se inocula a suspensão da levedura e incuba-se sob temperatura e tempo adequados. As provas positivas podem ser traduzidas pela turvação das microcúpulas ou pela mudança de sua coloração, sendo o resultado comparado com um banco de dados fornecido pelo fabricante. Os métodos automatizados mais difundidos são o Microscan® e o Vitek®. São sistemas controlados por computador, que incubam painéis contendo os substratos desidratados, os quais são rehidratados com a suspensão da levedura, e os resultados das provas bioquímicas são automaticamente interpretados (Ferreira and Sousa 2000, Barbedo and Sgarbi 2010).



**Figuras 12 e 13:** Da esquerda para a direita: Exemplo de sistema manual (adaptado de <http://www.nationalanalyticalcorp.com>) e de sistema automatizado (adaptado de <http://www.biomerieux-usa.com>).

## 2.4) Tratamento convencional

As actuais opções terapêuticas disponíveis no campo da micologia têm ajudado a combater, dentro do possível, as infecções fúngicas superficiais e sistêmicas. Deve-se salientar que, para seleccionar a melhor e mais eficaz terapia na prática clínica, é importante conhecer a etiologia, a epidemiologia, os tratamentos prévios que não foram bem sucedidos, a severidade da infecção, o estado imunitário do indivíduo, o mecanismo de acção do fármaco, a sua rapidez de actuação e a sensibilidade do fungo (Lass-Flori, Perkhofer et al. 2010).



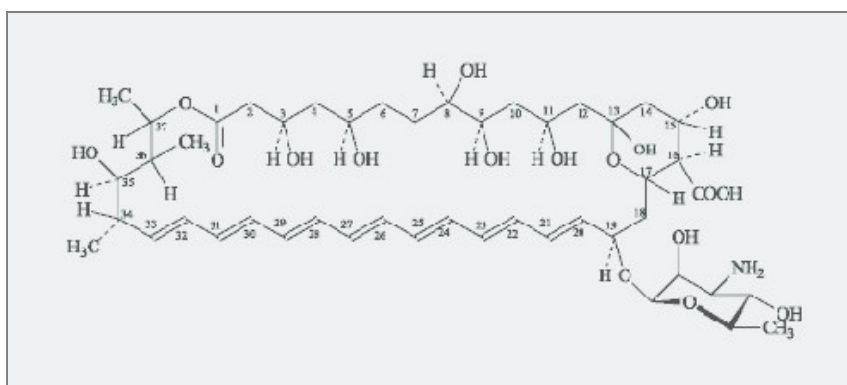
Cada composto antifúngico apresenta vantagens e limitações relacionadas com a sua toxicidade; portanto, a escolha deve ser o mais cuidadosa possível de modo a obter o máximo benefício e o mínimo de efeitos adversos no decorrer do tratamento (Lass-Flörl, Perkhofer et al. 2010).

Baseados no seu mecanismo de acção, a generalidade dos fármacos antifúngicos utilizados nas candidíases pode ser agrupada em três classes principais.

#### 2.4.1) Polienos

São antifúngicos de largo espectro de acção, produzidos por bactérias do género *Streptomyces*. Incluem-se nesta classe a nistatina, a anfotericina B, a natamicina, etc. Actuam por ligação ao ergosterol da membrana celular, para o qual têm grande afinidade, levando à formação de canais que resultam na despolarização da membrana celular fúngica e morte celular. Ligam-se também aos esteróis intracelulares causando danos, especialmente nas vias de oxidação (Chen and Sorrell 2007, Cuenca-Estrella 2010).

A nistatina é utilizada topicamente para tratamento de candidíases cutâneas. A anfotericina B foi o primeiro fármaco a ser utilizado em infecções profundas e continua a ser a primeira escolha para o tratamento desse tipo de infecções como por exemplo aspergilose invasiva, candidíase invasiva, criptococose e infecções por zigomicetos. A natamicina é utilizada como antifúngico tópico de uso oftálmico. Os polienos apresentam em geral actividade fungicida em *Candida* (Chen and Sorrell 2007, Cuenca-Estrella 2010, Parente-Rocha, Bailao et al. 2017).



**Figura 14.** Estrutura química da anfotericina B (adaptado de Filippin and Souza 2006).

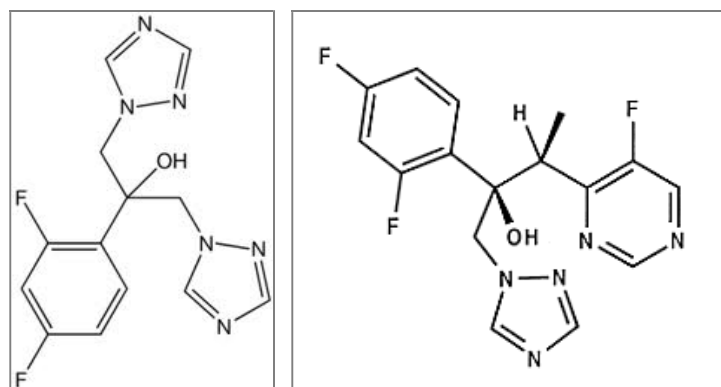
---

#### 2.4.2) Azóis

Os azóis são moléculas sintéticas que se dividem em dois grupos: imidazóis e triazóis. Actuam ligando-se ao grupo heme, constituinte das enzimas responsáveis pela síntese de ergosterol do citocromo P450, resultando na inibição do crescimento das células fúngicas. Comparando com os imidazóis, os triazóis têm uma afinidade cem vezes superior para as enzimas do citocromo P450 dos fungos relativamente às dos mamíferos, o que em termos de perfil de segurança dá mais garantias. Apesar disso, qualquer azol pode provocar hepatotoxicidade e possíveis interacções com outros fármacos metabolizados pelo mesmo citocromo (Filippin and Souza 2006, Cuenca-Estrella 2010).

Do grupo dos imidazóis fazem parte o cetoconazol, o miconazol, o clotrimazol e o econazol. Estes antifúngicos estão limitados ao tratamento de infecções superficiais através de formulações tópicas, sendo activos em leveduras e dermatófitos, e apresentando actividade fungistática em *Candida* (Cuenca-Estrella 2010) .

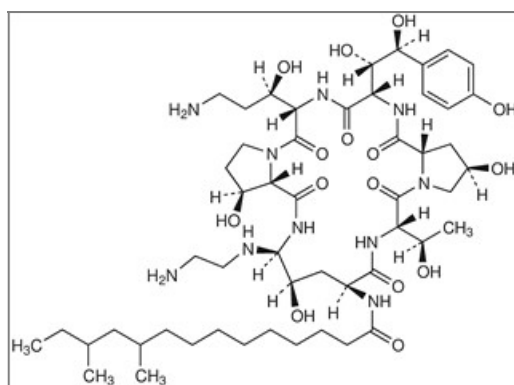
O grupo dos triazóis inclui moléculas de primeira e de segunda geração. Os de primeira geração são representados pelo fluconazol e pelo itraconazol que exibem eficácia no tratamento de várias infecções superficiais e sistémicas. O fluconazol apresenta uma boa actividade contra *Candida* mas tem-se verificado muitas resistências em espécies como *C. krusei*, intrinsecamente resistente, e *C. glabrata*. O itraconazol tem um espectro mais alargado que o anterior, é também activo contra vários fungos filamentosos, tendo como inconveniente a sua baixa biodisponibilidade oral. Verificou-se que os fungos resistentes ao fluconazol acabam por adquirir resistência cruzada ao itraconazol. Os triazóis de segunda geração são representados pelo voriconazol e pelo posaconazol, que possuem um amplo espectro contra leveduras e fungos filamentosos. O seu uso deve ser cuidadoso devido ao número de interacções, variabilidade farmacocinética e efeitos secundários marcados (Filippin and Souza 2006, Cuenca-Estrella 2010, Parente-Rocha, Bailao et al. 2017).



**Figuras 15 e 16.** Da esquerda para a direita: Estrutura química do fluconazol (adaptado de <http://dermas.info>) e do voriconazol (adaptado de <http://www.pharmazeutische-zeitung.de>).

### 2.4.3) Equinocandinas

Este grupo de fármacos é constituído por lipohexapéptidos cíclicos semi-sintéticos pertencentes à classe das candinas. O primeiro fármaco deste grupo foi a caspofungina, ao qual se seguiram a micafungina e a anidulofungina. O mecanismo de acção reside na capacidade de inibição da enzima 1,3- $\beta$ -glucano-sintetase, necessária para a formação de polímeros de 1,3- $\beta$ -glucano, um dos componentes da parede celular fúngica. A inibição desta enzima impede a síntese de glucano que causa fragilidade osmótica celular e posterior morte da mesma. A toxicidade associada a estes antifúngicos não é frequente pois a sua acção é específica para a parede celular fúngica (Chen and Sorrell 2007, Cuenca-Estrella 2010).



**Figura 17.** Estrutura química da caspofungina (adaptado de <https://www.medicinescomplete.com>).

As principais limitações das opções terapêuticas actuais incluem um espectro de

---

actividade limitado, interações com numerosos fármacos, perfil farmacocinético incompatível, toxicidade marcada, custo excessivo por vezes e falta de eficácia devido às resistências crescentes que acompanham o aumento das infecções antifúngicas e a subsequente utilização de antifúngicos em larga escala (Chen and Sorrell 2007, Cuenca-Estrella 2010).

## **2.5) Diagnóstico em medicina tradicional chinesa (Escola de Heidelberg)**

Em medicina tradicional chinesa (MTC) as patologias são encaradas de uma forma diferente do que ocorre na medicina ocidental. A abordagem não é feita tendo em conta a presença do microorganismo mas sim, considerando o conjunto de sinais e sintomas que se desenvolvem e que permitem estabelecer o estado vegetativo do organismo (Greten 2013). A *Candida spp* é um fungo leveduriforme, que é saprófita numa percentagem elevada de indivíduos saudáveis, especialmente presente nos tractos gastro-intestinal e genito-urinário, como já foi referido. Logo, o que desencadeia a patologia são os factores inerentes ao indivíduo e que permitem a passagem deste fungo de saprófita a patogénico.

Uma das grandes diferenças da MTC em relação à medicina convencional é a individualização do diagnóstico, o que à partida, vai fazer com que indivíduos diferentes com sintomas semelhantes possam ter um diagnóstico e tratamento distintos.

Antes de abordar a questão mais específica do diagnóstico, convém explicar algumas bases da MTC segundo o Modelo de Heidelberg.

Os conceitos mais elementares da MTC são o *yin* e o *yang*. São termos usados para descrever a relação funcional de dois conceitos interdependentes, têm um significado original, metafórico e também matemático e podem ser convertidos em termos técnicos (na tabela entre parênteses) (Greten 2013).

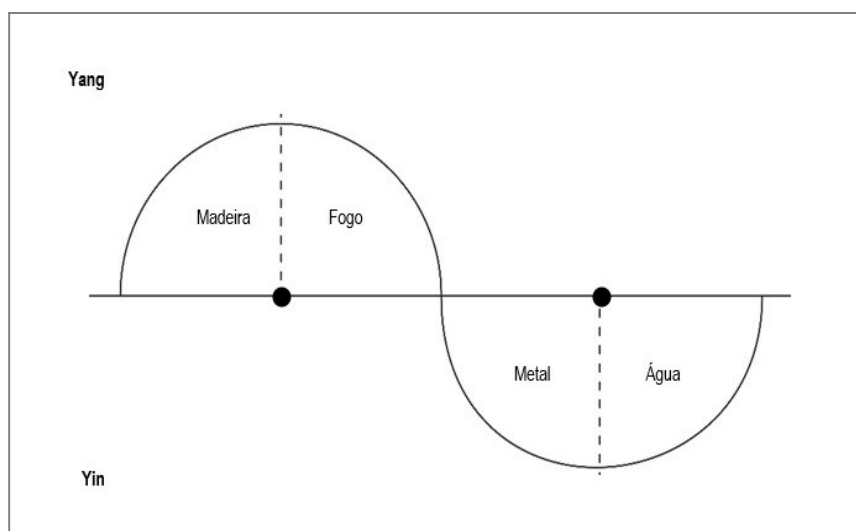
Assim temos significados como:

**Tabela 1.** Os diferentes significados de *yin* e *yang* (adaptado de Greten 2013).

<b><i>Yang</i></b>	<b><i>Yin</i></b>
Mais actividade (repleção)	Menos actividade (depleção)
Mais quente ( <i>calor</i> )	Mais frio ( <i>algor</i> )
Exterior ( <i>extima</i> )	Interior ( <i>intima</i> )
Actividade potencial ( <i>yang</i> )	Estrutura ( <i>yin</i> )

Outro conceito essencial em MTC é a característica cíclica da homeostasia e fisiologia humanas que são traduzidas em medicina chinesa por fases. A descrição das fases pode ser feita segundo uma curva sinusoidal e ocorre de forma cíclica (circular) continuamente no tempo. Desta forma, as fases são um processo circular, são termos cibernéticos/reguladores (a fase precedente domina/regula a fase seguinte do processo cíclico). Quando nos referimos ao ser humano, as fases comportam-se como tendências funcionais/vegetativas (o diagnóstico fisiopatológico do ser humano é feito com base nestes vectores de diagnóstico) e as manifestações clínicas são denominadas de orbes - grupos de sinais relevantes para o diagnóstico (Greten 2013).

Esta curva é então dividida em quatro partes que representam as quatro fases do movimento de regulação. Devido ao contexto histórico em que o conceito de fase foi criado, cada uma delas foi descrita como elemento da natureza. Assim, surgem as quatro fases conhecidas por Madeira, Fogo, Metal e Água, sendo o eixo em torno do qual a curva sinusoidal ocorre a Terra (centro).



**Figura 18.** A curva sinusoidal das fases *yang* e *yin* (adaptado de Greten 2013).

---

Cada fase tem associada a si orbes que indicam o estado funcional de uma parte do corpo ou do paciente. Cada um destes grupos de sinais relevantes está alocado a regiões corporais e por isso, recebem o seu nome: a fase Madeira irá manifestar-se pelas orbes hepática (fígado) e felleal (vesícula biliar), a fase Fogo pelas orbes cardial (coração), tenuintestinal (intestino delgado), tricalórica (triplo aquecedor) e pericárdica (pericárdio); a fase Metal manifesta-se pelas orbes pulmonar (pulmão) e crassintestinal (intestino grosso); a fase Água por sua vez manifesta-se pelas orbes renal (rim) e vesical (bexiga) enquanto que a Terra manifesta-se pelas orbes estomacal (estômago) e lienal (baço-pâncreas) (Greten 2013).

A patologia em MTC pode ocorrer então devido a quatro factores:

- Excesso de um agente
- Problemas de transição de uma fase para a seguinte
- Desequilíbrio de fases antagonistas
- Deficiência de *yin*.

Pensando agora nos quatro componentes do diagnóstico e subcomponentes:

a) constituição

b) agente

c) orbe

d) critérios-guia:

d.1) sinais neurovegetativos (deplecção - replecção)

d.2) sinais humoro-vegetativos (*calor* - *algor*)

d.3) estádios neuro- imunológicos (*exterior/extima* - *interior/intima*)

d.4) deficiência estrutural vs deficiência regulatória (*yin-yang*) (Greten 2013).

a) Constituição: como se expressa fenotipicamente e etologicamente o paciente?

A constituição é uma parte do diagnóstico que define a natureza interior do paciente como uma expressão do seu fenótipo. Em MTC há o conceito de que a estrutura física altera o comportamento funcional do Homem, logo os seus sentimentos, funções e a probabilidade de certos sintomas (Greten 2013).

b) Agente: o que afecta o paciente?

O factor patogénico, o chamado agente, é que provoca a patologia. É um vector funcional que altera o comportamento normal tendo em conta a constituição do paciente.

---

Esta alteração resulta directamente na afectação de algumas partes do organismo e por isso, provoca sintomas que são tidos como anormais e patológicos pelo paciente. Estes agentes podem ser exteriores, interiores ou neutros (Greten 2013).

c) Orbe: que padrões funcionais provocam os sintomas?

Uma orbe é um círculo ou grupo de sinais e sintomas que são importantes do ponto de vista do diagnóstico. São nomeados por órgãos ou regiões corporais onde alguns desses sintomas ocorrem e estão associadas a uma fase (Greten 2013).

d) Critérios-guia: interpretação dos sintomas no contexto da regulação geral do organismo

Há quatro critérios-guia que têm como base quatro modelos reguladores da fisiologia. Pode-se dizer que um critério-guia é uma avaliação dos sinais clínicos de acordo com o modelo fisiológico subjacente. A origem de cada sintoma é em MTC visto como um problema que surge devido à insuficiente regulação.

d.1) Repleção- Depleção: como está a capacidade funcional do paciente?

O primeiro critério-guia refere-se à capacidade funcional induzida maioritariamente pelo sistema vegetativo (Greten 2013). Este sistema inclui as regulações neurovegetativas efectuadas pelo sistema nervoso simpático, parassimpático e sistema nervoso entérico. Incluem-se neste nível de regulação uma série de sintomas quotidianos como: reacções de stress, tensão muscular, desequilíbrios emocionais e espirituais, exaustão e necessidade de regeneração. Este nível de regulação revê-se na medicina chinesa principalmente na teoria de *repletio* / *depletio* (repleção/depleção) isto é sobre a "plenitude" ou "vazio" de *qi*, numa aproximação grosseira ao conjunto de "controlo vegetativo" e à activação de um tecido que estará presente no nível sensorial de forma aumentada ou diminuída (Greten 2007).

d.2) *Calor-algor*: de que forma foi activada/reduzida a perfusão sanguínea?

De acordo com a fisiologia ocidental, a regulação humoral reflecte os seus efeitos ao nível da capilaridade, da circulação e na interacção entre o plasma e endotélio através de factores como hormonas de crescimento, prostaglandinas, prostaciclina, leucotrienos, factores imunes, ou hormonas. Os efeitos clínicos destes mecanismos estão em MTC

---

relacionados com a actividade do *xue* (considerado "sangue"), cuja condição é descrita de *calor / algor* ("calor" / "frio"). No modelo de Heidelberg falamos sobre os efeitos dos fluídos corporais que se deslocam (*xue*) principalmente como resultado de mudanças que ocorrem no sangue capilar (Greten 2007).

d.3) Exterior-interior: qual a acção imunológica desencadeada?

O 3º critério-guia relaciona-se com o conceito de que, frequentemente, o organismo é atacado por agentes externos que, no caso de um sistema defensivo deficitário, podem invadir o interior (Greten 2013).

Na vida quotidiana ocorre a interacção constante entre estes mecanismos de defesa, o sistema imunitário sob a acção do sistema nervoso, e os agentes potencialmente patogénicos. Por esta razão, a medicina chinesa desenvolveu o conceito de "neuroimunologia clínica", que é referido como estádios ou camadas de defesa do exterior para o interior - Algor-Laedens Theory (ALT) ou Teoria do Frio Nocivo (Greten 2007).

A resposta imunológica aqui abordada considera que houve contacto do agente externo *algor* com o organismo. Pressupõe-se, em MTC, que o contacto inicial deste agente é feito com a primeira linha de defesa intacta do organismo (*qi defensivum*- reside na *extima*, é exterior aos condutos). Segundo a MTC, existem 3 linhas de defesa externas/*extima* e 3 linhas de defesa internas/*intima* (cada uma representa um grau de profundidade diferente e sucessivo). Compreende-se que todas estejam intactas e que, sendo assim, o agente externo *algor* apenas interaja com o *qi defensivum* e que este não permita a passagem para outras linhas de defesa mais profundas. No entanto, se alguns dos factores que levam à patologia estiverem presentes, esta defesa inicial pode ser ultrapassada e permitir a entrada até à segunda linha de defesa e assim sucessivamente. À medida que o agente vai atingindo os diferentes estádios, surgem os sinais e sintomas das orbes que os representam e a resposta imunovegetativa do organismo (Greten 2015a).

Na *extima*:

**Estádio I (*Yang Major*)** - Afecta o *qi defensivum*; sintomatologia relacionada com as orbes vesical (bexiga) e tenuintestinal (intestino delgado): arrepios, tremores de frio,



---

palidez, mialgia, membros e pés frios, diarreia, micção frequente com urina de cor pálida, retenção de fluídos, etc (Greten 2015a).

**Estádio II (*Splendor Yang*)** - afecta o *qi* do conduto; sintomatologia relacionada com as orbes estomacal (estômago) e crassintestinal (intestino grosso): afectação dos sentidos, edemas, tosse, dor no pescoço, ombros e antebraço, desconforto abdominal, obstipação, febre, etc. Neste estágio ALT, o organismo manifesta sintomas mais exacerbados do que o agente externo invasor em si, de forma a eliminá-lo através da geração de calor reactivo (Greten 2015a).

**Estádio III (*Yang Minor*)** - afecta o *xue* do conduto; sintomatologia associada às orbes felleal (vesícula biliar) e tricalórica (triplo aquecedor): instabilidade de sintomas; sensações de calor e frio; dores lombares, tinitus, perda de audição, dor do ombro, náuseas, etc. Este estágio representa uma situação em que o calor reactivo produzido no estágio anterior é insuficiente para combater o agente *algor*. É necessário eliminar o agente externo para que este não atinja a *intima* (Greten 2015a).

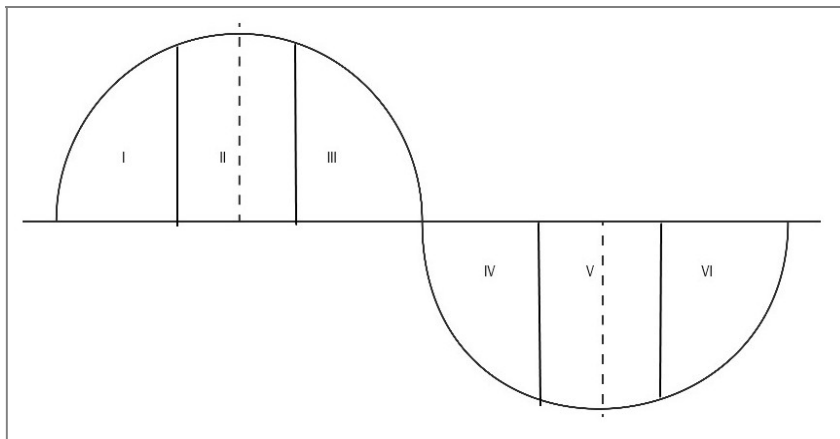
Na *intima*:

**Estádio IV (*Yin Major*)** - afecta o *qi* da ilha corporal; sintomatologia associada às orbes pulmonar (pulmão) e lienal (baço/pâncreas): acumulação de *humor* (humidade) e *pituita* (fleuma), perda de apetite, muco, perturbações respiratórias, tosse, etc. Ocorre a diminuição da microcirculação, pelo que já não há geração de calor pelo organismo (Greten 2015a).

**Estádio V (*Yin Flectens*)** - afecta o *xue* da ilha corporal; sintomatologia associada às orbes hepática (fígado) e pericárdica (pericárdio): membros frios, fadiga extrema, fraqueza muscular, desmotivação e indecisão, palpitações, pressão no peito, etc. (Greten 2015a).

**Estádio VI (*Yin Minor*)** - ocorre deficiência de *yin*; sintomatologia associada às orbes renal (rim) e cardial (coração): incapacidade de se levantar, problemas de memória, tendência para a ansiedade, convalescença prolongada, desmaios, problemas circulatórios, perda de visão, audição e estado de alerta, etc. (Greten 2015a).

Para além do atingimento dos vários estádios sequencialmente, pode ocorrer a manifestação sintomatológica de diferentes estádios ALT não sequenciais que é denominada de *stage-hopping* (Greten 2015a).



**Figura 19.** Estádios do ALT (adaptado de Greten 2015a).

d.4) *Yin-yang*: Quão estável é a homeostasia, a regulação do organismo do paciente?

O quarto conceito que orienta a medicina chinesa é o da inter-relação da estrutura corporal e os sintomas. Do ponto de vista ocidental, pode-se referir que, para uma função corporal específica - *yang*, é necessária uma certa população celular que é parte da estrutura corporal - *yin*. Se o *yin* for insuficiente essa população celular será estimulada em excesso para que temporariamente aumente a sua função. Se a função não for possível de se manter, um défice funcional surgirá. É por isso que uma deficiência de *yin* resulta em mudança de sintomas provocada pela estimulação excessiva e pela falta de função (Greten 2013).

Os quatro critérios-guia constituem então a espinha-dorsal da fisiologia em medicina tradicional chinesa. O diagnóstico é estabelecido de uma forma hierárquica tendo em conta os sinais clínicos que são analisados à luz destes quatro tipos de sistemática. Estes quatro modelos básicos de fisiologia são portanto os pré-requisitos para um diagnóstico correcto (sistema de fases *yin yang*) (Greten 2013).

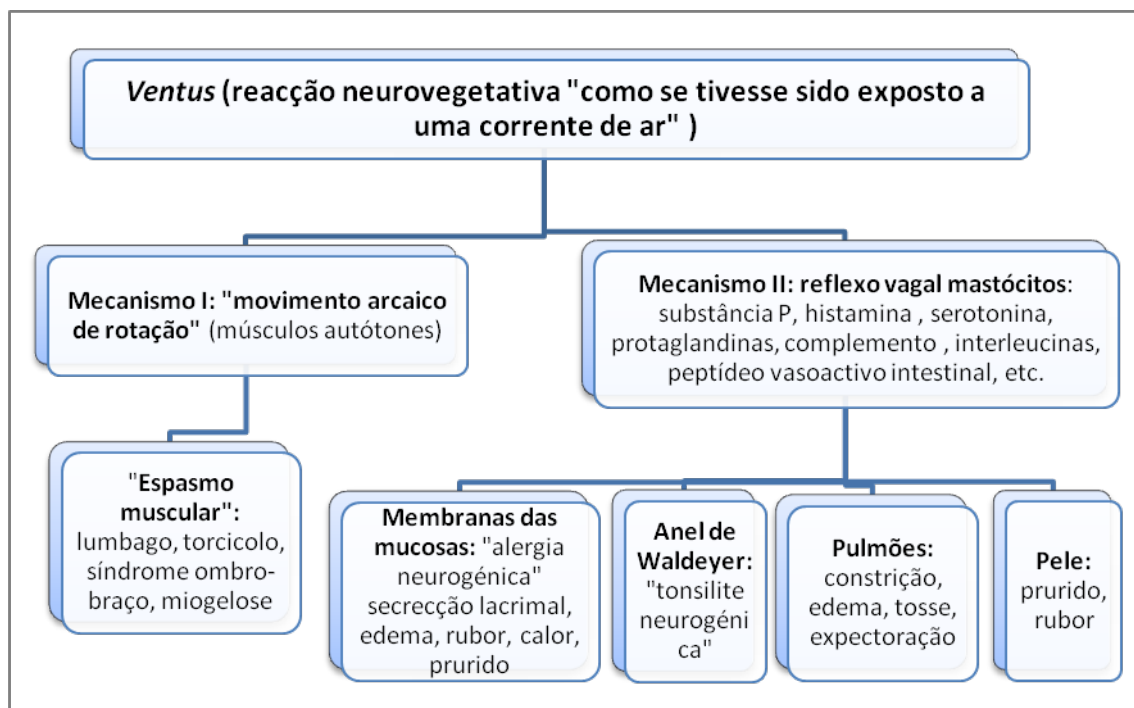
Tendo em conta todos os pontos mencionados, a informação recolhida pela anamnese, a observação dos sinais e sintomas do paciente, a análise da língua e a palpação dos pulsos radiais, permitem-nos estabelecer um diagnóstico personalizado. Obviamente que haveria muito mais a referir em relação ao diagnóstico em medicina

tradicional chinesa mas o que foi pretendido foi dar uma ideia da estrutura geral da obtenção do mesmo.

## 2.6) Patofisiologia em medicina tradicional chinesa (Escola de Heidelberg)

De acordo com o Professor Doutor Henry Johannes Greten que apresentou a candidíase segundo a Escola de Heidelberg, as constituições mais sujeitas a estas patologias são a constituição pulmonar e a constituição felleal (componente do diagnóstico: constituição).

Quando falamos em agente e na presença patogénica de *Candida* temos que pensar em *algor* (frio) que invade o organismo do exterior para o interior e que desencadeia sintomas como se o organismo estivesse sujeito ao frio climatérico. Consoante os sintomas, como por exemplo o prurido, podemos considerar também que, para além de *algor*, temos também *ventus* (vento), reacção neurovegetativa que provoca sintomas como se se estivesse exposto a uma corrente de ar (componente do diagnóstico: agente).



**Figura 20.** Possíveis reacções provocadas pelo agente *ventus* do ponto de vista ocidental (adaptado de Greten 2013).

---

A candidíase, como já foi mencionado, pode surgir em diferentes zonas do organismo e com diferente sintomatologia. Em MTC também podem ser diferentes as orbes afectadas que estão relacionadas com regiões corporais, pois representam um conjunto de sinais e sintomas (padrões vegetativos) bem definido nesta medicina. Assim, quando temos candidíase oral podemos pensar numa afectação da orbe do estômago e da orbe do intestino grosso por exemplo; numa candidíase cutânea na afectação da orbe pulmonar e numa candidíase vaginal recorrente nas orbes renal e felleal (vesícula biliar). Às orbes mencionadas podem-se juntar a orbe lienal (baço-pâncreas) se tivermos sinais como edema ou a felleal (vesícula biliar) em sinais como o prurido (componente do diagnóstico: orbe).

Falando dos critérios-guia há que considerar que o aparecimento, o tipo, e a gravidade dos sintomas das candidíases têm de ser analisados numa perspectiva global dos hospedeiros. Tendencialmente, as candidíases ocorrem num quadro deplectivo pois é necessário que ocorra um enfraquecimento no sistema imunitário (*qi defensivum*) e a consequente redução da actividade desse *qi* para que as leveduras se tornem patogénicas (componente do diagnóstico: primeiro critério-guia - deplecção/replecção).

Considerando a acção patogénica destes fungos ao nível da microcirculação, vamos pensar em *algor* (frio) pois há uma diminuição de microcirculação generalizada num estágio contra-inflamatório com consequente aumento de volume sanguíneo a nível central e redução do tónus do sistema simpático. No entanto, é importante considerar a possibilidade do organismo ainda conseguir produzir calor e surgirem sintomas localizados característicos de inflamação como dor, edema, vermelhidão e aumento de temperatura (componente do diagnóstico: segundo critério-guia - *calor/algor*).

Considerando a interacção com o sistema defensivo do hospedeiro, podemos pensar inicialmente num estágio I (orbes envolvidas tenuintestinal (intestino delgado) e vesical (bexiga)) onde o primeiro factor de defesa atingido é o *qi defensivum*. Sendo esse *qi defensivum* regulado pela orbe pulmonar (pulmão), esta tem que obrigatoriamente estar afectada e se houver sintomas como edema associado, temos um estágio IV já presente (orbes pulmonar (pulmão) e lienal (baço-pâncreas)) com afectação do *yin*. Quando neste estágio há uma reacção excessiva do organismo com produção de calor e edema intensos, podemos falar de um salto entre estádios (*stage hopping*) do estágio IV para o estágio II, um estágio exterior, menos grave, mas com sintomatologia exuberante. A presença de prurido vem associada com o agente exterior *ventus* que denota a presença de uma afecção felleal (vesícula biliar) que justifica a dor rasgante que pode

---

estar associada. Nestes casos, passamos a ter um estágio III com as orbes felleal (vesícula biliar) e tricalórica (triplo aquecedor) afectadas. O aumento dos sinais de calor neste estágio pode levar a novo salto entre estádios, desta vez para o estágio V (orbes hepática (fígado) e pericárdica (pericárdio) afectadas) que já é um estágio interior com o *yin* afectado. No caso dos indivíduos sujeitos a tratamentos de quimio e radioterapia, as defesas estão reduzidas, assim como a capacidade de produzir calor reactivo e por isso temos um estágio IV mas com a orbe estomacal (estômago) afectada só que sem a presença de calor. Não ocorre o salto entre estádios, estágio IV para estágio II, referido anteriormente. A imunossupressão também produz uma severa deficiência de *yang* pelo que são estes os pacientes que estão sujeitos à candidíase invasiva (componente do diagnóstico: terceiro critério guia- exterior/interior).

Finalmente reflectindo no último critério-guia, este está relacionado com os estádios afectados no processo patológico: até ao terceiro estágio será o *yang* (função) afectado (estádios exteriores) e do quarto ao sexto estágio (estádios interiores) temos já atingido o *yin* (estrutura).

## 2.7) Tratamento em medicina tradicional chinesa (Escola de Heidelberg)

A MTC tem cinco áreas de intervenção: acupuntura, *tuiná*, *qi gong*, dietética e fitoterapia. Esta última é uma das mais importantes e com maior percentagem de resultados. Em todo o caso, deverá sempre ser englobada com outras áreas para um tratamento holístico e com sucesso.

Na fitoterapia chinesa um fármaco/planta pode ser caracterizado através do *sapor*, da relação com a orbe, da temperatura, da tendência funcional e do grupo a que pertence (Greten 2015b).

**Sapor:** É um vector terapêutico que contraria a fase e reduz as manifestações ou sinais das mesmas, conduzindo para o valor alvo, são assim vectores centrípetos. Existem 6 *sapores* que podem apresentar vários efeitos clínicos:

### Sapor ácido

Actua na fase Madeira. Está relacionado com as orbes hepática (fígado) e felleal (vesícula biliar). Plantas com este *sapor* têm um efeito obstipante, preservam os fluídos, têm um efeito adstringente e de libertação de bloqueios (Greten 2015b).

---

### Sapor doce

Actua na fase Terra na orbe estomacal (estômago). Plantas com este *sapor* contribuem para a mobilização de energias activas (*qi* e *xue*), para a formação de fluídos, possuem efeito harmonizador, descendente e regulador, assim como uma acção sedativa e equilibrante do ponto de vista mental (Greten 2015b).

### Sapor amargo

Actua na fase Fogo, tendo relação com as orbes cardial (coração), pericárdica (pericárdio), tenuintestinal (intestino delgado) e tricalórica (triplo aquecedor). O *sapor* amargo tem uma acção descendente, arrefece o *ardor* e o *xue*, o que resulta numa redução de ardor e calor. Tem um efeito de secagem, de arrefecimento, de limpeza do *humor* e da *pituíta* e de drenagem (Greten 2015b).

### Sapor picante

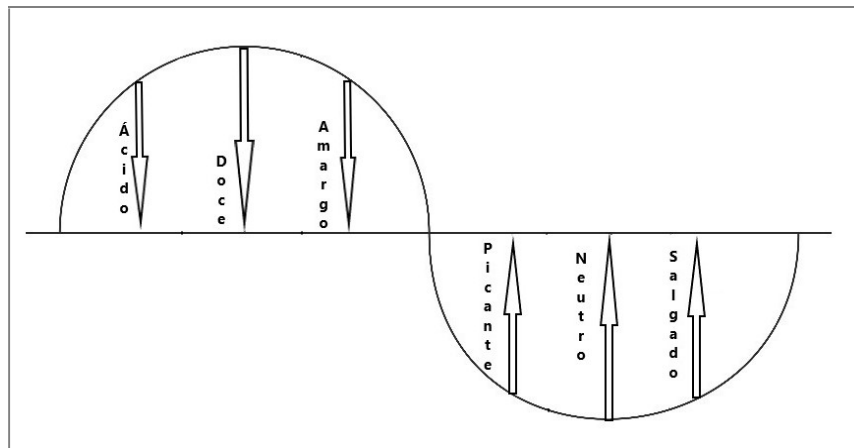
Actua na fase Metal, tendo relação com as orbes pulmonar (pulmão) e crassintestinal (intestino grosso). Auxilia na libertação de energias activas (*qi* e *yang*), activa os fluídos como o suor através da sua acção de abertura e de desbloqueio. Actua na *extima* com um movimento ascendente do *qi* (Greten 2015b).

### Sapor neutro

Actua na fase Terra na orbe lienal (baço-pâncreas), tem efeito no equilíbrio de fluídos, na potenciação da excreção e no suporte da assimilação (Greten 2015b).

### Sapor salgado

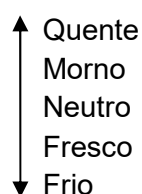
Actua na fase Água, associada ao *yin* e às orbes renal (rim) e vesical (bexiga). Tem um efeito de activação ou de suplecção do *yin* (actua na *intima*). Este último é o mais pronunciado e está associado a efeitos como humedificação, amolecimento, recolha e construção de fluídos (Greten 2015b).



**Figura 21.** Representação dos *sapores* no modelo da curva sinusoidal (adaptado Greten 2015a).

**Relação com a orbe:** Cada *sapor* tem efeito numa determinada fase e consequentemente actua em orbes específicas. Pode ocorrer uma relação directa: o *sapor* tem efeito nos sintomas da respectiva fase; ou uma relação indirecta: o *sapor* tem efeito nos sintomas da fase complementar, o que ocorre quando o *sapor* tem uma acção muito forte (Greten 2015b).

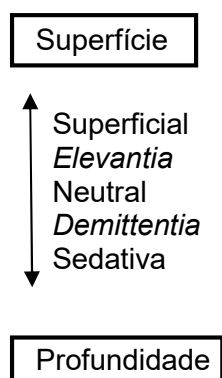
**Temperatura:** Consoante o seu efeito na microcirculação, as plantas têm uma capacidade de aquecimento ou de arrefecimento. Para além da natureza da própria planta, na sua temperatura tem de se considerar a forma de preparação da mesma (Greten 2015b).



**Figura 22.** Classificação dos fitofármacos de acordo com a sua temperatura (adaptado de Greten 2015b).

A maioria das plantas de temperatura fria ou fresca elimina calor e fogo e diminui a virulência dos organismos patogénicos; são adequadas às doenças de natureza quente. A maioria das plantas de natureza morna ou quente dissipa o frio e revigora o *yang*; são indicadas para doenças de natureza fria. Algumas drogas são neutras, o que significa que não há uma temperatura destacada, o seu efeito é mais suave (AEMFTC 2004).

**Tendência funcional:** A tendência funcional de um fármaco ou a sua direcção efectiva é influenciada pela soma do *sapor* e da temperatura (Greten 2015b). Desta forma podemos ter:



**Figura 23.** Tipos de tendência funcional de um fármaco (adaptado de Greten 2015b).

Todas as drogas que têm uma tendência ascendente no sentido da superfície são caracterizadas por sentidos para cima e para fora e têm efeitos de dispersão e de ascensão, enquanto que todas as drogas descendentes no sentido da profundidade são caracterizadas por efeitos de sentido para baixo, de interiorização e têm efeitos de supressão na ascensão patológica (AEMFTC 2004).

Relacionando os *sapores* e a temperatura, podemos referir que na generalidade drogas que são picantes e doces, mornas e quentes são, na sua maioria, de sentido ascendente e de superficialização. Drogas que são amargas, ácidas e salgadas, frescas e frias são, na sua maioria, de sentido descendente e de aprofundamento. Os medicamentos obtidos a partir de flor e folha, partes exteriores da planta, são leves no peso e têm, habitualmente, um sentido ascendente, enquanto que drogas mais pesadas, tais como as obtidas a partir de sementes, consideradas partes internas da planta, têm um sentido descendente (AEMFTC 2004).

**Grupo:** Todas as características referidas anteriormente permitem alocar as plantas a diferentes grupos. Foram criados 19 grupos principais organizados em 5 meta-grupos que reflectem as principais aplicações das plantas:

Meta-grupos:

Grupos I a IX- utilizados em infecções;

Grupo X- utilizados nas desordens psicossomáticas;

Grupos XI e XII- para tratar a dor;



---

Grupo XIII- para tratar a *pituíta* crónica;

Grupos XIV a XVI a)- para fornecer energia nas patologias crónicas;

Grupos XVI b) a XIX- usados raramente e como tal não vão ser abordados.

Esses 5 meta-grupos englobam 19 grupos principais que são:

Grupos I a IX:

Ia) – *Liberantia extimae acria et calida*;

Ib) – *Liberantia extimae acria et frigida*;

II – *Antiemetica*;

III – *Purgativa*;

IVa) – *Refrigerantia caloris diffundentia ardoris*;

IVb) – *Refrigerantia orbem hepatici et clarificantia oculi*;

IVc) – *Refrigerantia xue*;

IVd) – *Refrigerantia et Torrefacientia*;

IVe) – *Refrigerantia desinfectantia*;

V – *Aromatica Patefacientia*;

VI – *Aromatica transformatoria humoris*;

VII – *Diuretica exstillantia humoris*;

VIII – *Expellentia venti et humoris*;

IX – *Tepefacientia intimae*.

Grupo X :

Xa) – *Sedativa deprimentia pavoris*;

Xb) – *Sedativa sustinentia mentis*;

Xc) – *Sedativa pacantia orbem hepatici*.

Grupos XI e XII:

XI – *Regulatoria qi*;

XIIa) - *Animantia xue*;

XIIb) - *Continentia xue*.

Grupo XIII:

XIIIa) – *Transformatoria pituitae algidae*;

XIIIb) – *Frigida transformatoria pituitae calidae*;

---

XIIIc) – *Tussostatica*.

Grupos XIV a XVII:

XIV – *Concoquentia*;

XVa) – *Supplentia qi*;

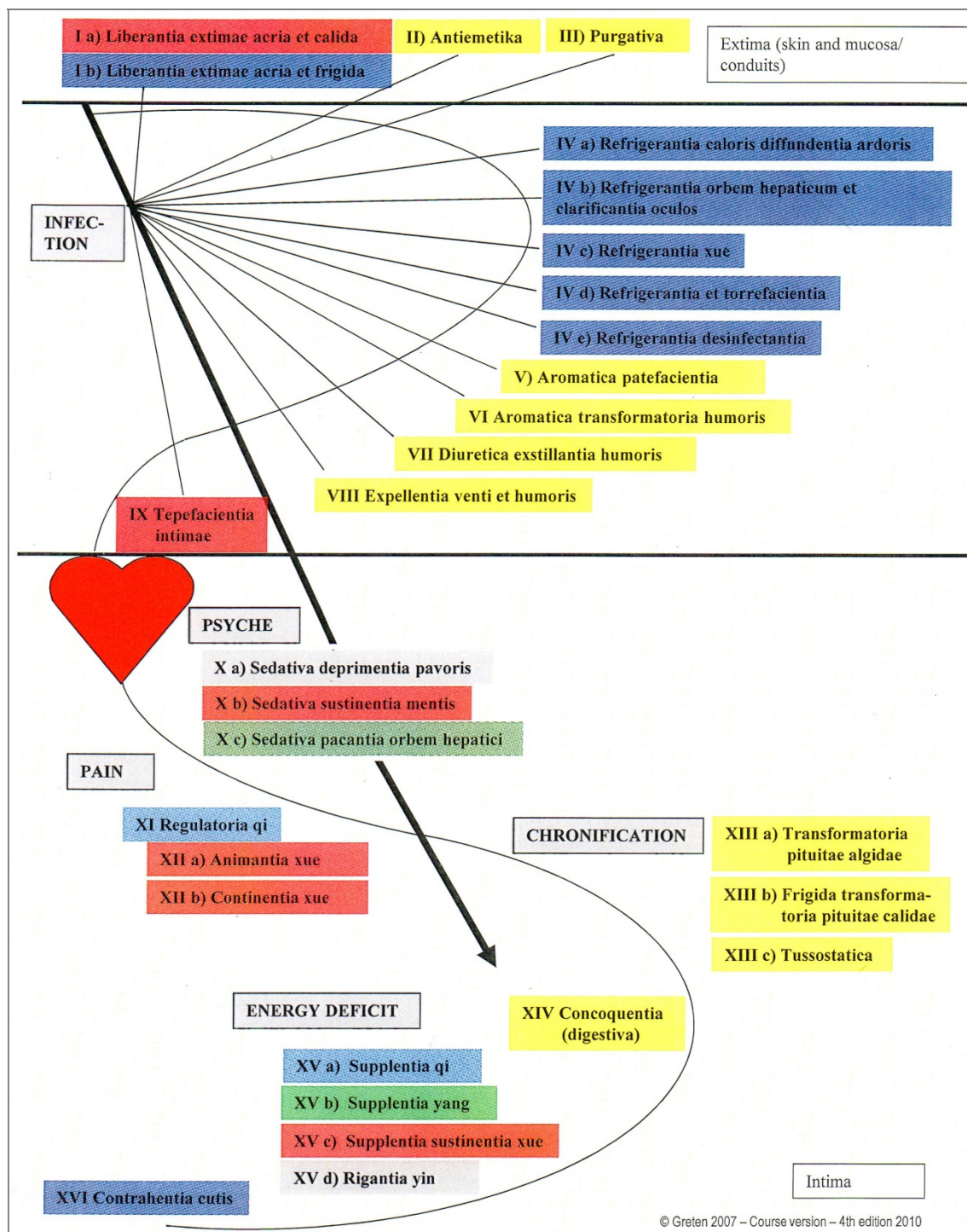
XVb) – *Supplentia yang*;

XVc) – *Supplentia sustinentia xue*;

XVd) – *Rigantia yin*;

XVI – *Contrahentia cutis*.

(Greten 2015b)



**Figura 24.** Principais grupos da farmacologia chinesa (adaptado de Greten 2015a).

Tendo em conta todas estas considerações, a escolha das plantas indicadas no tratamento das candidíases depende de indivíduo para indivíduo, sintomas apresentados, estádios afectados e agentes envolvidos de acordo com o diagnóstico efectuado.

Outro ponto importante relaciona-se com a complexidade e alteração das condições patológicas. Por vezes podemos ter sintomas à superfície como no interior do

---

organismo, pode haver uma repleção ou depleção, ou o frio e o calor podem estar envolvidos no mesmo quadro. Nesses casos, o uso de um só medicamento falha em produzir o efeito terapêutico desejado, requerendo a aplicação de um maior número de plantas que sejam compatíveis. Essa administração combinada pode melhorar os efeitos terapêuticos, tratar mais desequilíbrios, reduzir os efeitos tóxicos e colaterais (AEMFTC 2004).

Assim sendo, utilizam-se preparações com várias plantas e a decocção é a forma de preparação mais utilizada em MTC. Numa decocção habitualmente há quatro partes:

- Imperador ou Governador (*Emperor* ou *Ruler*): é o ingrediente com acção principal na decocção representando a direcção principal do tratamento da patologia. Habitualmente encontra-se na maior quantidade.
- Ministro (*Minister*): o objectivo é ajudar o imperador a produzir o efeito desejado. Potencia o efeito do Imperador e actua na mesma direcção deste, complementando-o.
- Assistente (*Assistant*): actua no mesmo sentido que os componentes principais já mencionados, modulando a acção do Imperador por exemplo reduzindo efeitos secundários.
- Guia (*Signalling Drug*): direcciona o efeito da decocção para uma orbe, uma parte do corpo ou para o tratamento de um estágio.

A utilização da fitoterapia nas diferentes candidíases pressupõe desta forma um diagnóstico correctamente efectuado, um conhecimento aprofundado das características das plantas e a sua utilização de forma combinada, obtendo uma fórmula personalizada, direccionada para o restabelecimento do equilíbrio entre a interacção agente patogénico-hospedeiro.

---

## **II. Materiais e Métodos**

---

### 3.1) Reagentes

MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propano-sulfónico), DMSO (dimetilsulfóxido) e prolina foram adquiridos à Sigma® (St. Louis, MO, Estados Unidos da América).

Hidróxido de sódio (NaOH) era da Panreac® (Barcelona, Espanha).

Meio RPMI (com L-glutamina, sem bicarbonato e com o indicador de pH vermelho fenol) foi comprado à Biochrom AG® (Berlim, Alemanha) e meio Sabouraud à Biomérieux® (Marcy L'Étoile, França) assim como as ampolas API® (NaCl 0,85%).

Base azotada para leveduras foi adquirida à Difco® (Nova Jérсия, Estados Unidos da América).

Voriconazol era da marca Pfizer® (Nova Iorque, Estados Unidos da América).

### 3.2) Amostras

A escolha das plantas relacionou-se com o seu uso tradicional como antissépticos/antibacterianos. *Coptidis chinensis*, *Magnolia officinalis* e *Scutellaria barbata* são utilizadas pela medicina tradicional chinesa, *Azadirachta indica* pela medicina tradicional ayurveda e *Leptospermum scoparium* pela medicina tradicional maori. Estas duas últimas plantas foram caracterizadas de acordo com os princípios da fitoterapia tradicional chinesa, demonstrando que a MTC é uma ciência actual e dinâmica que se aplica a tudo o que nos rodeia. A utilização de decocção foi uma opção por ser a forma tradicional de preparação da fitoterapia em MTC e os óleos essenciais seleccionados devido ao seu potencial farmacológico já demonstrado em numerosos estudos.

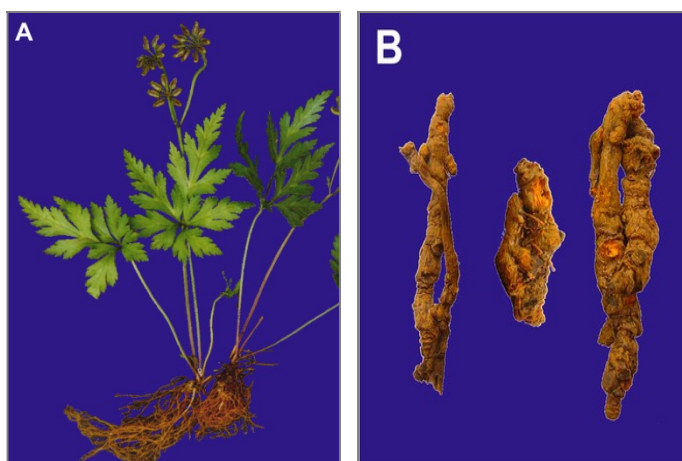
#### 3.2.1) *Rhizoma Coptis chinensis*

O rizoma coptidis, conhecido como Huang Lian na China, é o rizoma seco de plantas medicinais da família Ranunculaceae como o *Coptis chinensis* Franch, *C. deltoidea* C.Y. Cheng et Hsiao e *C. teeta* Wall, que tem sido utilizado em MTC há mais de 2000 anos (WHO 1999, Wang, Mu et al. 2014, Yang, Ning et al. 2015, Tan, Chan et al. 2016). O *Coptis chinensis* Franch e o *C. deltoidea* C.Y. Cheng et Hsiao são plantas chinesas enquanto que o *C. teeta* Wall encontra-se na Índia (WHO 1999).

### 3.2.1.1. Descrição e características organolépticas

A planta do *Coptis chinensis* é uma erva perene. Todas as folhas são em forma oval-triangular e recortadas. As hastes das flores são de 1 a 2 em número, iguais ou maiores que o comprimento da folha. As sementes são de 7 a 8, oblongas, com cerca de 2mm e castanhas. O seu período de floração é de Fevereiro a Abril e o período de frutificação de Março a Junho (WHO 1999).

O rizoma é curvo, reunido em aglomerados que se assemelham a “pés de galinhas”. Possui cerca de 3-6 cm de comprimento e 3-8 mm de diâmetro, é áspero, externamente apresenta uma cor entre o acinzentado, amarelo ou castanho-amarelado, tendo saliências irregulares. De textura dura, casca de cor vermelho-alaranjado ou castanho escuro, madeira brilhante e de cor amarela ou amarelo-alaranjado. A medula é, por vezes, oca. Tem um odor suave e o sabor é muito amargo (WHO 1999).



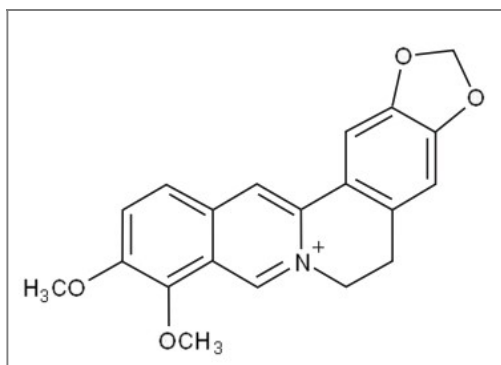
**Figuras 25 e 26.** Da esquerda para a direita: (A) Planta completa e (B) rizoma seco de *C. chinensis* (adaptado de Xiang, Wu et al. 2016).

### 3.2.1.2. Composição química

A maior parte dos constituintes químicos do rizoma coptidis são alcalóides incluindo a berberina, a coptisina, a worenina, a palmatina, a jatrorrizina e a epiberberina (WHO 1999, Wang, Mu et al. 2014).

Os mecanismos da acção do rizoma coptidis não estão completamente esclarecidos (Khodavandi, Tahzir et al. 2013, Yang, Ning et al. 2015) mas pensa-se que a

berberina, o componente activo maioritário, seja o principal responsável pelos seus efeitos farmacológicos, e numerosos estudos têm sido efectuados com esta molécula (Mekseepralard, Kamkaen et al. 2010, Khodavandi, Tahzir et al. 2013, Wang, Mu et al. 2014).



**Figura 27.** Estrutura química da berberina (adaptado de WHO 1999).

#### 3.2.1.3. Acções farmacológicas

Actualmente estão comprovadas as acções antiprotozária e antibacteriana de largo espectro (ex. em *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc.) (Khodavandi, Tahzir et al. 2013, Greten 2015b), os efeitos anti-hipertensivos, anti-inflamatórios e antioxidantes (Wang, Mu et al. 2014, Yang, Ning et al. 2015). A acção antifúngica tem despertado interesse recentemente, havendo já vários estudos (Yang, Ning et al. 2015).

#### 3.2.1.4. Caracterização chinesa

De acordo com a caracterização tradicional chinesa, o rizoma *Coptidis* é amargo (*sapor*), frio (temperatura), sedativo (tendência funcional) e actua nas orbes cardial (coração), lienal (baço-pâncreas), estomacal (estômago), hepática (fígado), felleal (vesícula biliar) e crassintestinal (intestino grosso) (Wang, Mu et al. 2014, Greten 2015b). Segundo o modelo de Heidelberg, pertence ao grupo IVd) *Refrigerantia et Torrefacientia* (Greten 2015b).



---

### 3.2.1.5. Indicações terapêuticas

Tem como funções arrefecer o calor, secar a humidade e eliminar as toxinas da fase fogo (Greten 2015b). As principais indicações incluem o tratamento da *diabetes mellitus* (síndrome *Xiao-Ke*), da obesidade, da hiperlipidemia, da distensão e enfartamento estomacal devido a humidade e calor, da émise, do refluxo gastroesofágico, da icterícia, da diarreia de origem bacteriana, da febre elevada, das palpitações devido à hiperactividade do coração, inquietude e insónias, da hemoptise ou epistaxe devido a calor no sangue, da congestão e vermelhidão ocular, da odontalgia, da odinofagia, do carbúnculo e da doença inflamatória do intestino (AEMFTC 2004, Mekseepralard, Kamkaen et al. 2010, Khodavandi, Tahzir et al. 2013, Wang, Mu et al. 2014, Greten 2015b, Tan, Chan et al. 2016). Frequentes vezes é associado a outras plantas para obtenção de acção terapêutica mais específica e com resultados optimizados e diminuição de efeitos secundários como aliás é um dos princípios da fitoterapia chinesa (AEMFTC 2004, Greten 2015b).

### 3.2.1.6. Contra-indicações

O coptidis deve ser utilizado com precaução em casos de deficiência de *yin*, em pacientes com *algor* e com depleção ao nível do centro pois, em uso por tempo prolongado, pode lesar o funcionamento normal do estômago e provocar aumento de apetite, náuseas ou vômitos e perda de fluídos (AEMFTC 2004, Greten 2015b).

### 3.2.2) *Cortex Magnolia officinalis*

Conhecido como *houpo* em chinês, consiste na casca da árvore *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils., ou *M. officinalis* Rehd. et Wils. var. *blioba* Rehd et Wils., pertencente à família das Magnoliaceae, que é utilizada historicamente na medicina tradicional asiática há centenas de anos (AEMFTC 2004, Lee, Lee et al. 2011, Poivre and Duez 2017).

As magnólias encontram-se distribuídas especialmente na parte este e sudeste da China e são muito atractivas graças ao seu aroma e belas flores, que também são utilizadas em MTC (Poivre and Duez 2017).

### 3.2.2.1. Descrição e características organolépticas

A casca do tronco e dos ramos é retirada de Abril a Junho e deixada a secar na sombra, é ligeiramente cozinhada em água a ferver e colocada num local húmido até que a superfície interna fique castanha-arroxeadada ou castanha escura. Amolecida pela humidade é enrolada e seca (Poivre and Duez 2017). A casca seca tem uma cor castanho acinzentada com lentículas ovais em estrias longitudinais. Tem uma fragância, sabor picante e ligeiramente amargo.

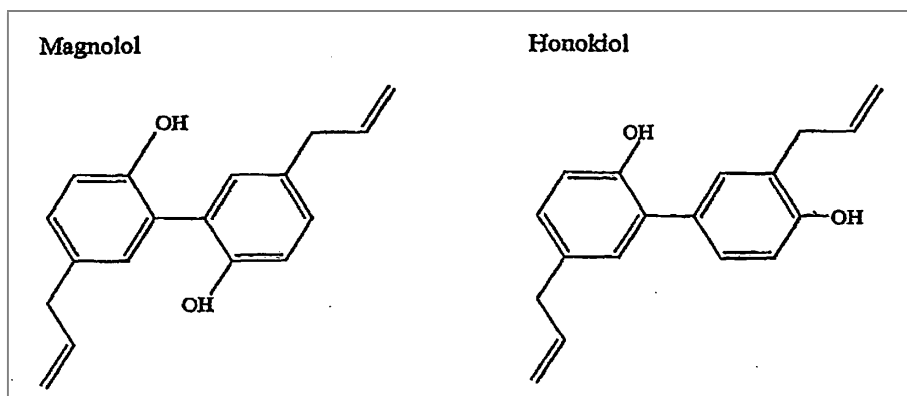


**Figuras 28 e 29.** Da esquerda para a direita: partes aéreas e cascas de *Magnolia officinalis* (adaptado de <http://www.alchemicabotanica.com>).

### 3.2.2.2. Composição química

A casca da magnólia contém pelo menos 255 compostos diferentes incluindo alcaloides, cumarinas, flavonoides, lignanas, neolignanas, fenilpropanoides e terpenoides. Destes destacam-se os derivados das neolignanas, magnonol e honokiol que são considerados os compostos biologicamente mais activos (Liu, Han et al. 2011, Poivre and Duez 2017).

Os alcaloides também são um grupo interessante de metabolitos secundários desta espécie que produz essencialmente alcaloides do tipo isoquinolina como a magnoflorina e a magnocurarina e que começam agora a ser estudados (Poivre and Duez 2017).



**Figura 30.** Estruturas químicas magnolol e honokiol (adaptado de Poivre and Duez 2017).

### 3.2.2.3. Acções farmacológicas

Várias actividades farmacológicas (anticancerígena, anti-stress, anti-ansiedade, antidepressiva, antioxidante, anti-inflamatória e hepatoprotectora) têm vindo a ser investigadas, *in vitro* e *in vivo*, utilizando a casca da magnólia e os seus constituintes. O seu uso no tratamento da asma, em perturbações do sistema gastro-intestinal onde é necessária uma acção antiespasmódica, na diabetes, na atenuação da doença de Alzheimer e na arteriosclerose estão comprovados, mas a maior parte dos mecanismos que levam a essas acções não estão elucidados (Lee, Lee et al. 2011, Liu, Han et al. 2011, Poivre and Duez 2017). Em relação à actividade antibacteriana o honokiol e magnonol são eficazes contra bactérias Gram positivas como *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus anthracis*, etc. (Liu, Han et al. 2011, Poivre and Duez 2017).

### 3.2.2.4. Caracterização chinesa

De acordo com a caracterização tradicional chinesa, a casca da magnólia é amarga e pungente (*sapores*), morna (temperatura), superficial (tendência funcional) e actua nas orbes do pulmão, do lienal (baço-pâncreas), do estômago e do crassintestinal (intestino grosso) (AEMFTC 2004, Greten 2015b). Segundo o modelo de Heidelberg pertence ao grupo VI) *Aromatica transformatoria humoris* (Greten 2015b).

---

### 3.2.2.5. Indicações terapêuticas

Tem como funções activar a circulação do *qi* bloqueado por *algor*, eliminar a humidade e aliviar a estase (AEMFTC 2004, Greten 2015b). Tradicionalmente, é utilizada associada a outras plantas em decocções compostas, no tratamento da depressão, da ansiedade, da tosse, de alergias, da asma, de patologias gastro-intestinais, da dor no ombro, dos problemas urinários e da diarreia, da dor de cabeça e da febre (Lee, Lee et al. 2011, Sun, Liao et al. 2015, Poivre and Duez 2017).

### 3.2.2.6. Contra-indicações

Deve ser utilizada em doses baixas pois a activação da circulação do *qi* quando em excesso pode ser drástica e levar à sua deplecção. Nesses casos deve ser associada a outras plantas que suplem o *qi* como é o caso de *Radix ginseng* (AEMFTC 2004).

### 3.2.3) *Herbae Scutellaria barbata*

As partes aéreas de *Scutellaria barbata* D. Don são usadas amplamente em medicina tradicional chinesa, sendo o seu nome chinês *Ban Zhi Lian* (Yu, Lei et al. 2004, Tang, Kang et al. 2016, Tao and Balunas 2016). Pertence à família das *Laminaceae* e apresentam-se na maior parte das terras baixas e húmidas do sudeste da China (Tao and Balunas 2016).

#### 3.2.3.1. Descrição e características organolépticas

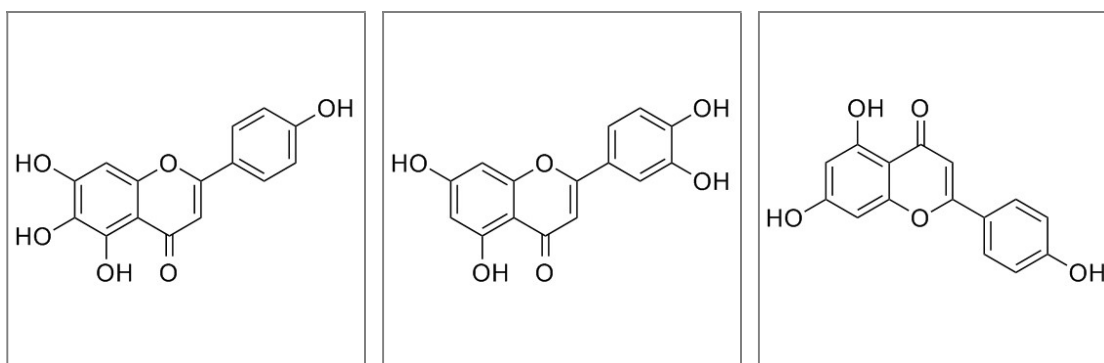
É uma erva perene que atinge cerca de 20-50cm, com hastes finas, em forma de coluna quadrada e com superfície verde escura ou acastanhada. Tradicionalmente colhida no final do Verão quando está em plena floração, as partes aéreas são secas para serem utilizadas como medicamento (Tao and Balunas 2016). Não apresenta quase odor e é ligeiramente amarga (Yu, Lei et al. 2004, Tang, Kang et al. 2016, Tao and Balunas 2016).



**Figuras 31 e 32.** Da esquerda para a direita: partes aéreas frescas e partes aéreas secas de *Scutellaria barbata* (adaptado de <https://tcmwiki.com>).

### 3.2.3.2. Composição química

A *Scutellaria barbata* contém um elevado número de alcaloides, flavonas, esteroides e polissacarídeos que são responsáveis pelo seu potencial no tratamento de várias patologias. Os componentes biologicamente activos são a escutelarina, a luteolina e a apigenina (Yu, Lei et al. 2004, Tang, Kang et al. 2016, Tao and Balunas 2016).



**Figuras 33, 34 e 35.** Da esquerda para a direita: Estrutura química da escutelarina, da luteolina e da apigenina (adaptado de Tao and Balunas 2016).

### 3.2.3.3. Acções farmacológicas

A *Scutellaria barbata* já demonstrou ser eficiente *in vitro* em várias linhas celulares tumorais. Há também estudos que comprovam a actividade anti-inflamatória. O óleo essencial de *S. barbata* é também bactericida contra bactérias Gram positivas como

---

*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Staphylococcus simulans*, *Enterococcus faecalis* entre outras. As flavonas demonstraram eficácia em estirpes de *Staphylococcus aureus* (Yu, Lei et al. 2004, Tang, Kang et al. 2016, Tao and Balunas 2016).

#### **3.2.3.4. Caracterização chinesa**

De acordo com a medicina tradicional chinesa o caule da escutelária é amargo (*sapor*), frio (temperatura) e sedativo (tendência funcional) e actua nas orbes cardial (coração), pulmonar (pulmão), estomacal (estômago) e hepática (fígado) (Tao and Balunas 2016).

#### **3.2.3.5. Indicações terapêuticas**

Tem como funções reduzir o calor eliminando o calor tóxico e também a humidade e a estase.

Em MTC tem-se distinguido devido às suas propriedades anticancerígenas sendo habitualmente combinada com outras plantas para tratar cancro dos pulmões, do fígado, da mama e do tracto gastrointestinal. Outras patologias estão relacionadas com infecções bacterianas ou inflamação, ambas com padrões de calor associadas como por exemplo: infecções respiratórias superiores (bronquites, faringites e traqueítes); infecções cutâneas (acne, celulite); infecções urinárias e doença inflamatória pélvica. Outras patologias inflamatórias incluem a hepatite, a nefrite, a colite ulcerosa e a apendicite não aguda (Yu, Lei et al. 2004, Tao and Balunas 2016).

A eliminação da humidade provoca diurese, que pode ser utilizada na redução de edema, abscessos, ou na acumulação de fluídos que surgem como sintomas de outras patologias. Também provoca uma ligeira hemóstase pelo que, juntamente com as suas propriedades antimicrobianas, pode ser considerada como uma boa hipótese no tratamento de picadas de insectos, de reptéis e outros cortes através da aplicação tópica. Finalmente pensa-se que tem a capacidade de promover a circulação sanguínea, o que pode reduzir a cirrose hepática e os hematomas (Tao and Balunas 2016).

---

### 3.2.3.6. Contra-indicações

A *Scutellaria barbata* é extremamente fria e amarga pelo que deve ser reservada para calor tóxico severo. Quando utilizada em pacientes com um centro fraco, pode levar à perda de apetite e a distúrbios gastro-intestinais como diarreia e indisposição que num paciente já enfraquecido podem levar à perda de *yin*. Para evitar estas situações, deve-se combinar a escutelária com outras plantas mais quentes equilibrando a fórmula de tratamento e fazer a toma por um curto período de tempo (Tao and Balunas 2016).

### 3.2.4) Sementes de *Azadirachta indica*

O nim (família *Meliaceae*, género *Azadirachta*) é uma árvore perene nativa da Índia e é cultivada em regiões tropicais e subtropicais a nível mundial. Todas as partes da árvore são utilizadas desde a antiguidade na medicina tradicional como remédios caseiros no tratamento de várias doenças (El-Hawary, El-Tantawy et al. 2013, Tyagi, Sinha et al. 2013, Ashfaq Ahmed, Gayathri et al. 2016, Campos, de Oliveira et al. 2016).

#### 3.2.4.1. Descrição e características organolépticas

São árvores de grande porte, podendo atingir até 30m de altura e 2,5m de diâmetro. Os frutos são lisos, elipsoides, de cor amarelada com uma polpa doce envolvendo as sementes, que são compostas por uma casca e um ou mais caroços. As flores são pequenas, brancas e possuem um perfume semelhante ao mel. A semente consiste num policarpo carnudo com uma concha moderadamente macia no seu interior, que armazena óleo (Campos, de Oliveira et al. 2016). Este óleo apresenta cor amarelo-esverdeado a castanho, sabor amargo e um cheiro forte a alho (Lloyd, Menon et al. 2005).

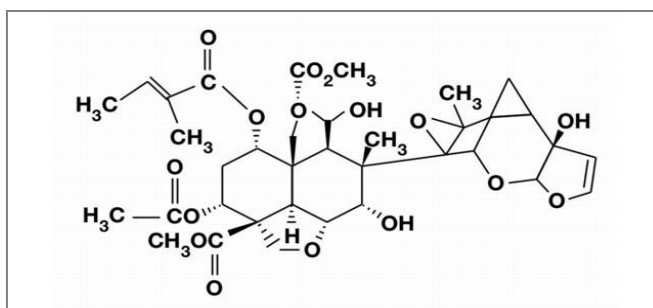


**Figuras 36, 37 e 38.** Da esquerda para a direita: árvore, frutos e sementes de *Azadirachta indica* (adaptado de <https://dir.indiamart.com>).

### 3.2.4.2. Composição química

O nim possui um vasto conjunto de compostos biologicamente activos que são quimicamente diversos e estruturalmente complexos. Mais de 140 compostos já foram isolados das diferentes partes do neem.

Falando das sementes e do óleo nelas contido: é um óleo vegetal obtido por pressão das sementes que contém pelo menos 100 compostos biologicamente activos. Entre estes salientam-se compostos triterpénicos, responsáveis pelo seu sabor amargo, conhecidos como limonoides, que têm como o seu representante maioritário a azadirachtina (Ashfaq Ahmed, Gayathri et al. 2016, Campos, de Oliveira et al. 2016). Outros compostos presentes incluem o meliantriol, a nimbina, a nimbidina, a nimbinina, os ácidos gordos (oleico, esteárico e palmítico) e a salanina (Campos, de Oliveira et al. 2016).



**Figura 39.** Estrutura química da azadiractina (adaptado de <http://insetimax.com.br>).



---

### 3.2.4.3. Acções farmacológicas

Actualmente, o nim tem actividade comprovada no controlo de crescimento e como repelente de insectos e de ácaros assim como efeito insecticida e acaricida conhecendo-se com bastante detalhe os seus mecanismos de acção (Campos, de Oliveira et al. 2016).

O nim é utilizado na indústria da cosmética em geles, sabões, champôs, cremes, etc devido à sua actividade anti-séptica e antimicrobiana em *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus pyogenes*, *Klebsiella aerugenes* e *Proteus* (Polaquini, Svidzinski et al. 2006, Kareru, Keriko et al. 2010, Dutta and Kundabala 2013).

Tem havido estudos, ainda iniciais, com resultados que demonstram actividade hipoglicemiante e potencial no tratamento da *diabetes mellitus* (Polaquini, Svidzinski et al. 2006, El-Hawary, El-Tantawy et al. 2013).

O extracto aquoso das sementes de nim foi também estudado tendo demonstrado acção imunoestimulante, acção quimioterápica e acção antiviral, esta última devido à nimbina e à nimbidina (Polaquini, Svidzinski et al. 2006, El-Hawary, El-Tantawy et al. 2013, Campos, de Oliveira et al. 2016).

### 3.2.4.4. Caracterização chinesa

Como já foi mencionado o nim não é uma planta utilizada em MTC, mas os princípios da fitoterapia chinesa podem ser aplicados actualmente a todo o tipo de plantas. Para esse efeito foi feita uma análise das sementes, decocção e óleo essencial pelo Professor Doutor Henry Johannes Greten seguindo esses mesmos princípios e de acordo com o método de Heidelberg.

As sementes e a decocção têm características semelhantes: são extremamente amargas e pungentes (*sapores*), frias (temperatura) e têm uma acção descendente (tendência funcional). Actuam na orbe do estômago. Devido a estas características têm efeito desinfectante, colerético e eliminam a humidade ao mesmo tempo que levam à produção de fluídos por parte do centro. O óleo é mais aromático do que as sementes, tem um odor sulfurado a alho/cebola, é mais amargo (*sapor*) e frio (temperatura). Actua

---

na orbe cardial (coração) e tenuintestinal (intestino delgado), move o centro e tem uma acção descendente (tendência funcional) (Greten 2017).

#### **3.2.4.5. Indicações terapêuticas**

A medicina Ayurveda utiliza o óleo e as sementes de nim em casos de infecções cutâneas bacterianas, acne, eczema, escabiose, dermatofitoses, lepra, tuberculose, malária, febre e patologias oculares devido às suas propriedades antibacterianas, antiprotozoárias, antifúngicas e analgésicas. Há também um uso tradicional do óleo de nim como contraceptivo e espermicida (Lloyd, Menon et al. 2005, Kareru, Keriko et al. 2010, Ashfaq Ahmed, Gayathri et al. 2016, Campos, de Oliveira et al. 2016).

#### **3.2.4.6. Contra-indicações**

O óleo e as sementes de nim não devem ser ingeridas especialmente por crianças pois já foram relatados vários casos de intoxicação com uma dose de 5-30mL que provocaram sintomas de Reye. Tendo uma função contraceptiva não deve ser utilizado por mulheres grávidas.

### **3.2.5) Óleo de partes aéreas de *Leptospermum scoparium***

*Leptospermum scoparium* J.R. Forst & G. Forst (manuka) pertencente à família Myrtaceae, é uma espécie nativa da Nova Zelândia, comum na Tasmânia e na Austrália (Porter and Wilkins 1998, Van Vuuren, Docrat et al. 2014). Registos iniciais da Nova Zelândia relatam, por parte dos Maori e dos primeiros colonos, o uso da casca, das folhas, das sementes e da seiva desta planta em suplementos alimentares e preparações farmacêuticas e medicinais (Porter and Wilkins 1998, Chen, Yan et al. 2016).

#### **3.2.5.1. Descrição e características organolépticas**

É um arbusto frondoso de folhas verdes com uma fragância forte e flores pequenas de cor rosa a branco. Pode-se encontrar isolado ou em aglomerados onde pode chegar a atingir os oito metros de altura e adapta-se a locais de altitude e condições

climatéricas distintas (Porter and Wilkins 1998, Van Vuuren, Docrat et al. 2014). As suas folhas quando utilizadas em infusão têm um sabor amargo (Lis-Balchin, Deans et al. 1996). O óleo de manuka é obtido por destilação a vapor das folhas e ramos (Maddocks-Jennings, Wilkinson et al. 2005) e é bastante aromático, de cor amarela clara.

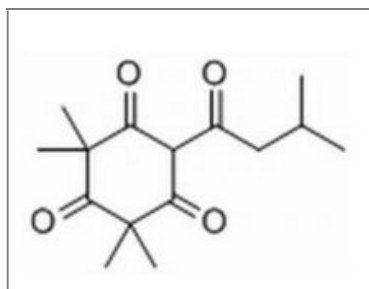


**Figuras 40 e 41.** Da esquerda para a direita: árvore e flores de *Leptospermum scoparium* (adaptado de <http://www.wildhoneymanuka.com>).

### 3.2.5.2. Composição química

Consoante a localização das plantas e a sua idade, a composição química do óleo de manuka apresenta uma grande variabilidade o que dificulta a sua caracterização e gera diferentes quimiotipos espontâneos (Lis-Balchin, Hart et al. 2000, Maddocks-Jennings, Wilkinson et al. 2005). Só na Nova Zelândia foram caracterizados pelo menos quatro quimiotipos distintos: i) um rico em tricetonas, ii) outro rico em linalool e eudesmol, iii) outro rico em pineno e iv) outro com défice em tricetonas, linalool e eudesmol (Porter and Wilkins 1998).

Um óleo de manuka será tanto mais interessante quanto maior for o seu conteúdo de tricetonas (Christoph, Kaulfers et al. 2000) que são as moléculas responsáveis pela maior parte da actividade antimicrobiana (Porter and Wilkins 1998). Dentro deste grupo salienta-se a leptospermona (Lis-Balchin, Deans et al. 1996).



**Figura 42.** Estrutura química da leptospermona (adaptado de (Porter and Wilkins 1998)).

Outras tricetonas encontradas foram a flavesona, a isoleptospermona, o cadina 3,5-dieno e o amorfeno (Porter and Wilkins 1998). Há também variados terpenóides como os sesquiterpenos que são um grupo importante em termos de concentração e actividade biológica. Estão também presentes tripenos e monoterpenos cuja concentração pode variar de 3 a 40% consoante a idade da planta (Maddocks-Jennings, Wilkinson et al. 2005).

#### 3.2.5.3. Acções farmacológicas

A eficácia antimicrobiana do óleo essencial de manuka em microrganismos patogénicos como *Candida albicans*, *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* tem sido investigada mas ainda com evidência clínica limitada (Van Vuuren, Docrat et al. 2014, Chen, Yan et al. 2016).

Na manuka as acções antimicrobianas são atribuídas às tricetonas, nomeadamente a leptospermona, a isoleptospermona e a flavesona (Van Vuuren, Docrat et al. 2014). Em quimiotipos não tão ricos em tricetonas os sesquiterpenos podem ter um papel importante na actividade anti-séptica, antibacteriana, analgésica e anti-inflamatória (Maddocks-Jennings, Wilkinson et al. 2005). A leptospermona em particular, para além das características já mencionadas, é um insecticida reconhecido e tem propriedades anti-helmínticas (Lis-Balchin, Deans et al. 1996).

#### 3.2.5.4. Caracterização chinesa

A manuka, à semelhança do nim, não é uma planta utilizada em MTC sendo que o seu óleo essencial foi caracterizado pelo Professor Doutor Henry Johannes Greten seguindo os princípios da fitoterapia chinesa e de acordo com o método de Heidelberg.

---

O óleo de manuka é aromático, um pouco pungente (*sapor*) e frio (temperatura) o que lhe confere actividade como libertador da *extima*, eliminador de humidade e desinfectante (Greten 2017).

### 3.2.5.5. Indicações terapêuticas tradicionais

Os povos indígenas da Nova Zelândia e Austrália, assim como os primeiros colonos, utilizavam os produtos da manuka para variadas patologias, incluindo infecções urinárias, cutâneas, gengivais, perturbações intestinais, constipações, tosse e queimaduras (Van Vuuren, Docrat et al. 2014). A decocção feita com as sementes era utilizada para tratar inflamações, disenteria, diarreia e cólicas. A decocção das folhas e casca da árvore mostrou-se eficaz para tratar inflamação do peito, rigidez muscular das costas e problemas oculares. Uma mistura de sementes e cascas moídas era utilizada para fazer emplastros para cicatrizar feridas e queimaduras. Finalmente a seiva era utilizada como colutório para tratar a boca e a garganta irritada (Lis-Balchin, Hart et al. 2000, Maddocks-Jennings, Wilkinson et al. 2005, Chen, Yan et al. 2016).

### 3.2.5.6. Contra-indicações

O óleo de manuka quando usado topicamente deve ser aplicado diluído noutro óleo neutro. Devido à sua actividade espasmolítica não deve ser utilizado na gravidez.

Na realização deste trabalho foram adquiridas à Magnolien Apotheke (Alemanha) as seguintes partes das plantas secas:

- rizomas de *Coptis chinensis* (coptidis);
  - sementes de *Azadirachta indica* (nim);
  - cascas de *Magnolia officinalis* (magnolia);
  - partes aéreas de *Scutellaria barbata* (escutelária);
- e os seguintes óleos essenciais extraídos por destilação a vapor:
- *Coptis chinensis* obtido dos rizomas;
  - *Azadirachta indica* obtido das sementes;
  - *Magnolia officinalis* obtido das cascas;
  - *Scutellaria barbata* obtido das partes aéreas;
  - *Leptospermum scoparium* (manuka) obtido dos ramos e galhos.



**Figuras 43, 44 e 45.** Da esquerda para a direita: cascas de *Magnolia officinalis*, sementes de *Azadirachta indica* e rizomas de *Coptis chinensis*.



**Figuras 46 e 47.** Da esquerda para a direita: partes aéreas secas de *Scutellaria barbata* e óleos essenciais de *Coptis chinensis*, *Leptospermum scoparium*, *Azadirachta indica*, *Magnolia officinalis* e *Scutellaria barbata* utilizados nas determinações e ensaios.

### 3.3) Estirpes utilizadas

A selecção das estirpes fúngicas a estudar foi feita tendo em conta a prevalência com que provocam candidíase humana e a gravidade do seu prognóstico.

#### 3.3.1) Candida albicans

*Candida albicans* faz parte da microbiota humana colonizando assintomaticamente diferentes áreas do organismo como o tracto gastro-intestinal, o

---

tracto geniturinário, a cavidade oral e a pele de indivíduos saudáveis. No entanto é o agente patogénico com maior prevalência sendo responsável por cerca de 50-90% das candidíases humanas (Ferreira and Sousa 2000, Winter, Salcedo et al. 2016)

*C. albicans* apresenta diferentes aspectos, entre eles, a habilidade de se apresentar com distintas morfologias. A fase unicelular leveduriforme pode gerar uma gémula e formar hifas verdadeiras. Entre esses dois extremos, gemulação e filamentação, o fungo ainda pode exibir uma variedade de morfologias durante o seu crescimento, formando assim as pseudo-hifas, que na realidade são leveduras alongadas unidas entre si. A mudança na morfologia de fase leveduriforme para filamentosa pode ser induzida por uma variedade de condições ambientais, como variação de temperatura e de pH (Barbedo and Sgarbi 2010).

As mudanças na micromorfologia ocorrem em função da expressão genética, que se reflectem na macromorfologia do desenvolvimento leveduriforme quanto à cor, que pode ser do branco ao creme, e ao aspecto pastoso, brilhante ou opaco. Porém, o estado leveduriforme pode evoluir para filamentoso, ou até mesmo uma combinação de células fúngicas leveduriformes e filamentosas (Barbedo and Sgarbi 2010).

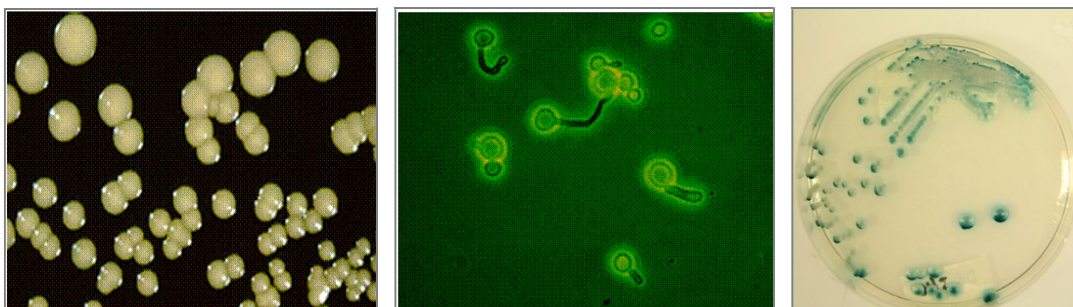
Esta levedura ainda tem a capacidade de formar clamidoconídios que são estruturas de resistência, formadas quando o fungo se encontra num local onde não há todos os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento (Ferreira and Sousa 2000, Barbedo and Sgarbi 2010).

Enquanto a hifa é a morfologia que melhor transpõe barreiras devido ao seu desenvolvimento filamentoso, a fase leveduriforme, pela sua morfologia arredondada, é a melhor para a disseminação eficiente. Em geral, a forma de levedura predomina durante a colonização no hospedeiro saudável, enquanto que as hifas surgem mediante a deficiência do sistema imunitário. Portanto, ambas as formas são de grande importância na patogénese, uma vez que podem ser requeridas em diferentes situações no hospedeiro (Barbedo and Sgarbi 2010).

É a espécie de *Candida* com maior conhecimento patogénico, devido à diversidade de factores de virulência descobertos. Para além da aderência e formação de hifas, outra característica de *C. albicans* é a de poder formar comunidades resilientes e resistentes aos fármacos em superfícies designadas por biofilmes, e ainda produzir

proteases (Ferreira and Sousa 2000, Barbedo and Sgarbi 2010, Rodrigues, Silva et al. 2014, Winter, Salcedo et al. 2016).

Esta espécie é naturalmente sensível a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico, mas casos de resistência adquirida aos fármacos convencionais como os azóis estão a tornar o tratamento em monoterapia cada vez mais difícil (Himratul-Aznita, Nor-Zulaila et al. 2016). A resistência pode ser devido ao uso inadequado destes fármacos ou surge em pacientes expostos prolongadamente aos antifúngicos (Goel, Rohilla et al. 2016).



**Figuras 48, 49 e 50.** Da esquerda para a direita: colónias de *C. albicans* destacadas em fundo escuro; formação de tubo germinativo e hifas; detecção de *C. albicans* em CHROMAgar® (adaptado de <http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases>).

### 3.3.2) *Candida glabrata*

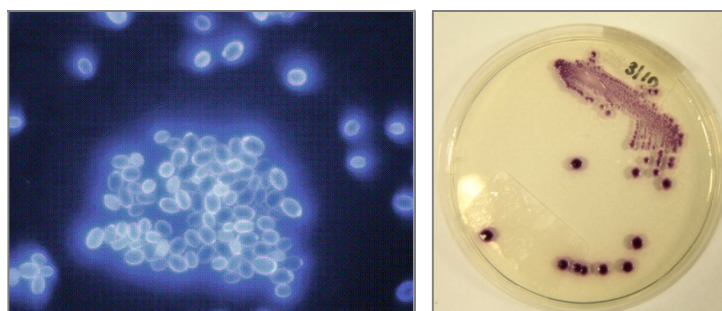
*Candida glabrata* pode ser considerada como saprófita e não patogénica na microbiota normal de indivíduos sãos, porém nas duas últimas décadas, como consequência de drogas imunodepressoras e com o advento do VIH, *C. glabrata* aumentou significativamente como agente de infeções em seres humanos, chegando a ser o segundo em casos de candidíases, principalmente em ambientes hospitalares (Rodrigues, Silva et al. 2014). Comparando-se a mortalidade entre outras espécies de *Candida* não *albicans*, a de *C. glabrata* é relativamente alta. Mais especificamente, a mortalidade é em torno de 50% em pacientes com cancro e 100% em complicações de transplante de medula óssea. De forma surpreendente, apesar de uma alta taxa de mortalidade, *C. glabrata* demonstra uma baixa virulência em modelos de infeções com animais. Esta estirpe emerge como um notável agente patogénico da mucosa oral e pode promover infeção concomitante com *C. albicans* e, em pacientes com cancro ou VIH-



positivos associada à infecção orofaríngea, pode ser mais severa e mais difícil de ser tratada que infecções por *C. albicans* (Barbedo and Sgarbi 2010).

*C. glabrata*, em relação a outras espécies de *Candida*, não é um fungo dimórfico, apresenta-se como blastoconídio, tanto como comensal como quando patogénico, e especialmente não forma pseudo-hifas a temperaturas acima de 37°C. Os blastoconídios de *C. glabrata* são menores que os de *C. albicans*; porém quando em meio de Sabouraud, formam colónias homogéneas, brilhantes, de coloração creme, como qualquer outra espécie de *Candida* (Barbedo and Sgarbi 2010, Rodrigues, Silva et al. 2014). Esta espécie também não tem a capacidade de secretar proteases, outro dos factores de virulência aliados à patogenicidade das *Candida*. O factor de virulência mais apresentado é a formação de biofilme onde é o agente etiológico mais comum (Rodrigues, Silva et al. 2014).

Isolados clínicos de *C. glabrata* apresentam menor sensibilidade ao fluconazol, consequentemente, um aumento nos índices de colonização e infecção por *C. glabrata* tem sido observado em diferentes grupos de pacientes com exposição prolongada ao fluconazol. Além dos problemas terapêuticos de infecções por *C. glabrata* associados aos azóis, estudos mostram uma menor sensibilidade também para a anfotericina B e às equinocandinas. Outro aspecto sobre a epidemiologia deste patógeno é sua maior ocorrência em pacientes idosos (Barbedo and Sgarbi 2010, Rodrigues, Silva et al. 2014).

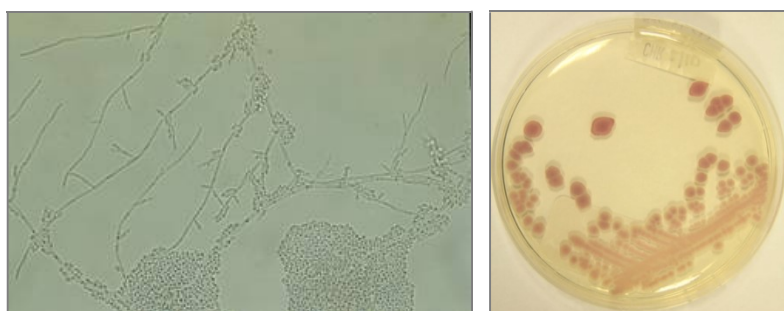


**Figuras 51 e 52.** Da esquerda para a direita: imagem microscópica de *C. glabrata* e detecção de *C. glabrata* em CHROMAgar® (adaptado de <http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases>).

### 3.3.3) *Candida krusei*

*C. krusei* tem sido reconhecida como um patógeno fúngico resistente a um amplo repertório de antifúngicos, principalmente devido a sua resistência intrínseca ao fluconazol, combinada com a baixa sensibilidade para a anfotericina B e à 5-fluorocitosina. Muitos autores têm reportado um avanço em infecções por *C. krusei* entre pacientes que receberam terapia com fluconazol e anfotericina B (Barbedo and Sgarbi 2010). Apesar da sua prevalência permanecer baixa entre as infecções fúngicas provocadas por leveduras (2-5%), é a sua resistência intrínseca ao fluconazol a razão pela qual infecções por esta estirpe têm a mortalidade mais elevada (30-60%) quando comparada com outras *Candida* (Li, Zhang et al. 2017).

O fenótipo de multirresistência exibido por *C. krusei* é um problema para o tratamento de pacientes em geral, principalmente grupos comprometidos. O voriconazol é usado com sucesso em infecções por *C. krusei*, e o grupo de antifúngicos equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina) tem demonstrado excelente actividade *in vitro*. Todavia, autores vêm relatando uma diminuição da sensibilidade para o voriconazol e as equinocandinas. *C. krusei* apresenta uma plasticidade com respeito a desenvolver resistência a antifúngicos, e assim como *C. glabrata*, é considerada uma importante espécie a ser monitorizada com relação à resistência antifúngica (Barbedo and Sgarbi 2010).



**Figuras 53 e 54.** Da esquerda para a direita: imagem microscópica de *C.krusei* e a sua detecção em CHROMAgar® (adaptado de <http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases>).

### 3.3.4) *Candida parapsilosis*

*Candida parapsilosis* é um microrganismo ubíquo habitualmente isolado do meio ambiente, no solo, na água e nas plantas. Esta espécie emerge como um importante

agente patogénico nosocomial (comensal, quando em indivíduo saudável) associada a cateteres, com manifestações clínicas que incluem fungemias, endocardites, endoftalmites, artrites e peritonites, e estas infecções usualmente ocorrem em associação a procedimentos invasivos ou dispositivos protéticos. Em alguns hospitais infantis, *C. parapsilosis* torna-se predominante em candidemias (Barbedo and Sgarbi 2010).

Esta espécie é mais frequente em infecções na corrente sanguínea, sobretudo em neonatos, pacientes transplantados, associadas a cateteres, e pacientes que recebem nutrição parenteral e prévia terapia antifúngica. A habilidade de produção de biofilmes está intimamente ligada à doença, e é morfologicamente diferente de *C. albicans*. Em estudos recentes, *C. parapsilosis* pode-se dividir em três grupos distintos (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*) com base em diversos critérios, incluindo análise de DNA, eletroforese de isoenzimas, eletroforese de cariótipos, morfotipos, sequências de DNA mitocondrial, habilidade de produção de biofilmes, entre outras. Isolados clínicos desta espécie são sensíveis a anfotericina B e aos derivados azólicos (Barbedo and Sgarbi 2010).



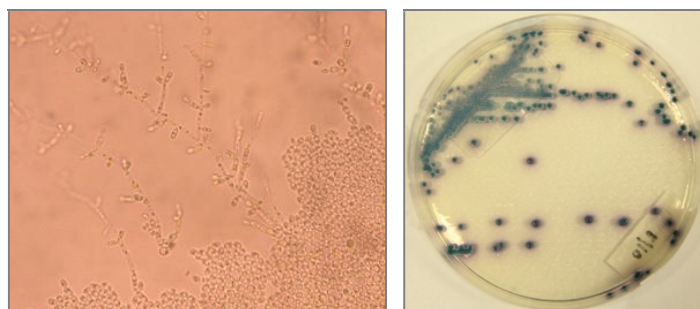
**Figuras 55, 56 e 57.** Da esquerda para a direita: Aspecto típico de colónias de *C. parapsilosis* e sua detecção em CHROMAgar® (adaptado de <http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases>).

### 3.3.5) *Candida tropicalis*

Recentes estudos comprovam que *C. tropicalis*, (levedura diploide de reprodução assexuada) é a terceira na causa de candidemias em adultos, especialmente em pacientes com linfoma, leucemia, complicações hematológicas malignas, *diabetes mellitus* e cancro. Em contraste, é raro encontrar esta espécie em neonatos (colonização mucocutânea); porém, o potencial de transmissão nosocomial é considerado. Contrariamente à *C. albicans*, que está associada à microbiota, a detecção de *C.*

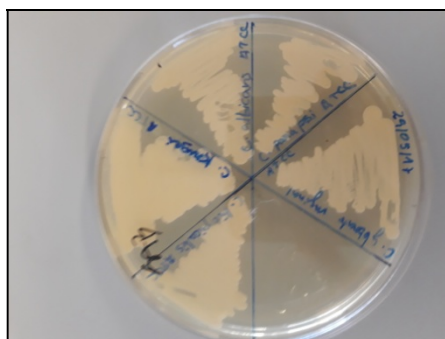
*tropicalis* é associada à infecção. *C. tropicalis* apresenta-se mais virulenta que *C. albicans* em pacientes com complicações hematológicas malignas e infecções disseminadas, portanto, com uma alta taxa de mortalidade (Barbedo and Sgarbi 2010).

Entre adultos com ou sem cancro, as infecções sistémicas por *C. tropicalis* estão associadas a taxas mais altas de mortalidade e disseminação do que por infecções devidas a *C. parapsilosis*. *C. tropicalis* é frequentemente sensível a derivados poliénicos e azólicos, porém em geral é resistente a 5-fluorocitosina (Barbedo and Sgarbi 2010).



**Figuras 58 e 59.** Da esquerda para a direita: Imagem de microscopia de *C. tropicalis* e a sua detecção em CHROMAgar® (adaptado de <http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases>).

A actividade antifúngica das várias amostras foi testada em relação a cinco estirpes de *Candida* spp. pertencentes ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto: *C. albicans* de colecção ATCC® 10231; *C. glabrata* vaginal de isolado clínico, *C. krusei* ATCC® 6258, *C. parapsilosis* ATCC® 22019 e *C. tropicalis* ATCC® 13803.

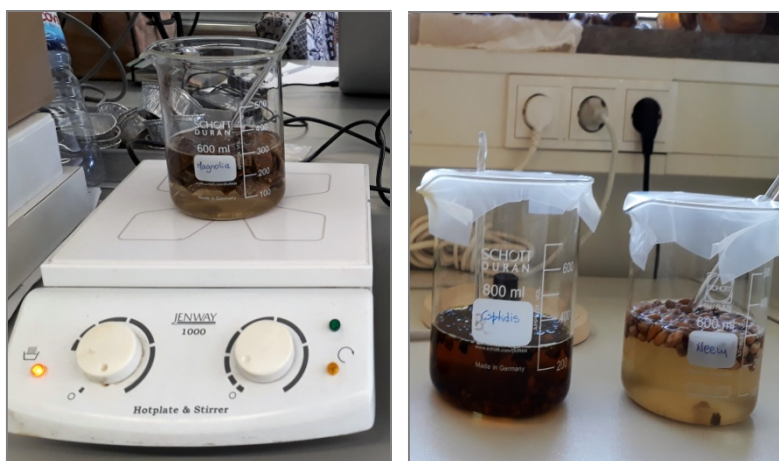


**Figura 60.** Subcultura de 24h em Sabouraud agar das estirpes de *Candida* spp. testadas.

Antes de se proceder aos ensaios, as diferentes leveduras foram subcultivadas em Sabouraud agar e incubadas a 36°C durante 24 horas, desta forma assegurando-se a pureza e a viabilidade das estirpes usadas.

### 3.4) Preparação das decocções

As decocções foram preparadas colocando 30gr de planta em 250 mL de água destilada, deixando demolhar durante 45 min e depois fervendo moderadamente durante 30 min. Após a fervura, as decocções foram deixadas a repousar até arrefecimento e foram filtradas.



**Figuras 61 e 62.** Da esquerda para a direita: fervura durante a preparação da decocção de cascas de *Magnolia officinalis* e arrefecimento das decocções de *Coptidis chinensis* e *Azadirachta indica* antes da filtração.

### 3.5) Ensaio prévio de difusão em placa

Para ter uma ideia do comportamento antifúngico das amostras, começou-se por fazer um ensaio simples de difusão em placa. A estirpe utilizada neste teste foi a *Candida albicans*. Previamente ao ensaio, foi realizada uma repicagem de *Candida albicans* em rampa de Sabouraud (SDA) que foi colocada durante 24h em crescimento a 36°C.

Uma alíquota das colónias isoladas foi transferida para água peptonada tamponada (APT). Posteriormente, com o auxílio de zaragatoa, procedeu-se ao

---

espalhamento em meio de cultura de SDA previamente preparado e vertido em placas de Petri. Colocaram-se discos impregnados com 20µl de cada amostra (óleo essencial e decocção) sem diluição, sobre a superfície do meio inoculado. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 24h. Passado esse tempo procedeu-se à observação do diâmetro dos halos inibitórios de cada disco.

### **3.6) Avaliação da actividade antifúngica**

A actividade antifúngica das decocções e óleos essenciais foi avaliada, determinando-se a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima letal (CML). A CMI foi determinada pela execução do procedimento descrito na norma CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) M27-A3 "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts" (CLSI 2008a) e no suplemento M27-S3 "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Third informational Supplement" (CLSI 2008b) com pequenas alterações.

A CMI é definida como "a concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo no teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo" (CLSI 2008b).

A CML foi efectuada de acordo com Lopes *et al* (Lopes, Pinto et al. 2013) e é definida como a concentração mais baixa de cada amostra que apresentou 100% de inibição de crescimento, resultante da subcultura das placas de CMI.

Todos os ensaios foram efectuados em duplicado e repetidos de duas a seis vezes.

#### **3.6.1) Determinação da CMI**

##### **3.6.1.1. Preparação do inóculo**

As suspensões de cada levedura testada foram preparadas a partir de culturas de 24h em meio de Sabouraud (SDA) em 2mL de NaCl 0,85% (ampolas API®). A densidade de cada suspensão foi ajustada de forma a obter no espectrofotómetro 0,5 McFarland

---

(equivalente a  $1-5 \times 10^6$  UFC/mL). Para obter as suspensões de trabalho, duas diluições das suspensões anteriores foram efectuadas, 1:50 seguida de 1:20, em meio RPMI 1640 obtendo-se suspensões finais de cada levedura de  $1-5 \times 10^3$  UFC/mL. Ao colocar nas placas o inóculo juntamente com cada uma das soluções a testar este será diluído de 1:2 e os inóculos finais terão entre 0,5 a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL.

### **3.6.1.2. Preparação das soluções de óleos essenciais e decocções das amostras**

Cada óleo essencial e cada decocção foram diluídos de 1:2 em DMSO, correspondendo a 500 µL/mL. A partir de cada uma destas soluções, foi preparada uma diluição em RPMI correspondente a uma concentração de 40 µL/mL (20 µL/mL na placa). A partir destas soluções iniciais, preparam-se as diluições sequenciais de 1:2 também em meio de cultura de RPMI até uma concentração de 0,03 µL/mL (0,15 µL/mL na placa).

### **3.6.1.3. Inoculação**

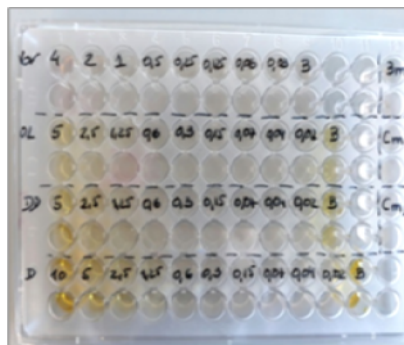
As inoculações foram realizadas em microplacas contendo 96 poços. Em cada poço foram adicionados 100 µL das diferentes concentrações de cada óleo/decocção e 100 µL da suspensão de cada levedura, diluindo para metade a concentração de cada um. Cada microplaca incubou a 36°C, no escuro, sem agitação e durante 48h. Posteriormente foi realizada a leitura macroscópica do crescimento por avaliação visual em cada concentração testada, sendo assim determinado a CMI para cada levedura e para cada amostra.

Em cada ensaio executado foram utilizados cinco tipos de controlos:

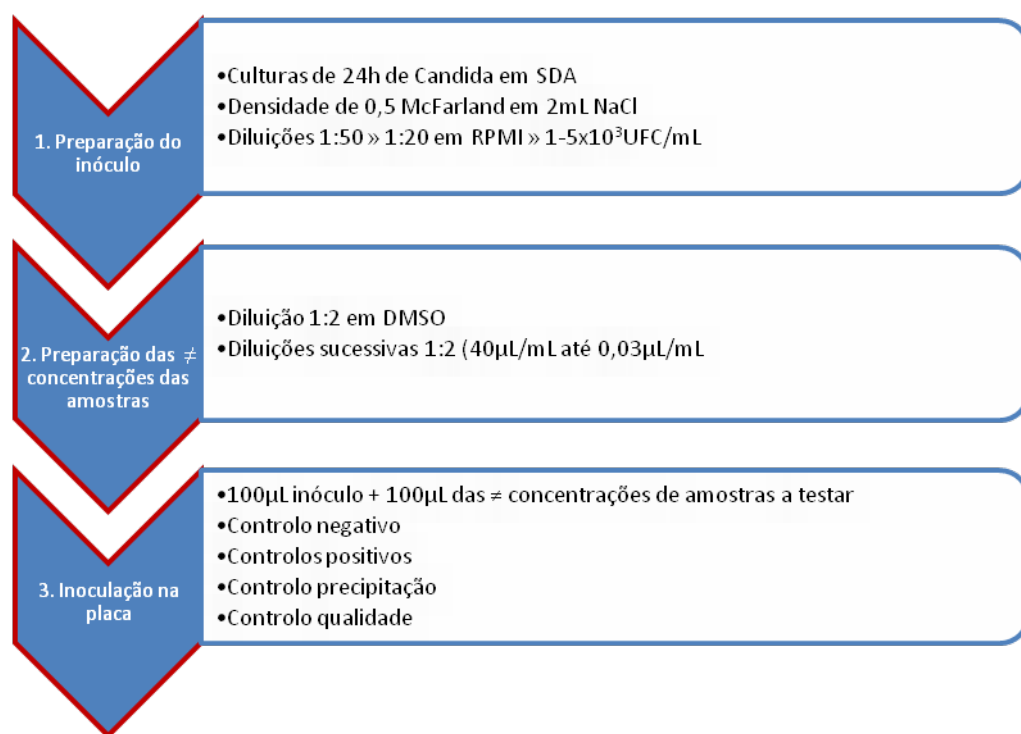
- controlo negativo com 200 µL de RPMI (para averiguar a esterilidade do meio);
- dois controlos positivos, um com 100 µL de RPMI e 100 µL de cada levedura testada e outro com 100 µL de RPMI com DMSO a 2% e 100 µL de cada levedura testada (para avaliar a presença de alguma interferência por parte dos meios no crescimento);
- controlo de precipitação com 200 µL da concentração mais elevada dos óleos/decocções estudados (para averiguar a formação de depósitos que pudessem interferir na visualização dos resultados)
- controlo de qualidade, preconizado pelo CLSI (CLSI 2008a, CLSI 2008b), onde foi usada a estirpe *C. krusei* ATCC® 6258 com um antifúngico de CMI conhecida, o voriconazol (para avaliar a reprodutibilidade e validade das condições de ensaio)



Os resultados foram validados tendo em conta os controlos efectuados.



**Figura 63.** Exemplo de microplaca de 96 poços para realização de ensaios para determinação de CMI.



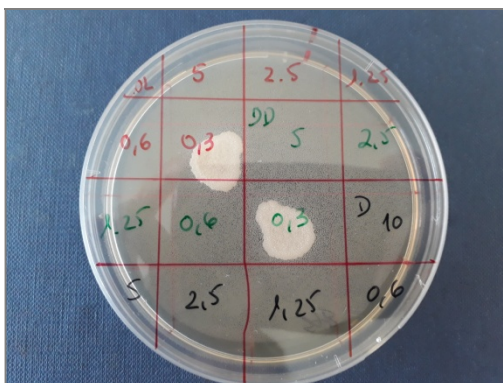
**Figura 64.** Fluxograma do procedimento de determinação da CMI.

### 3.6.2) Determinação da CML

A CML foi determinada por inoculação de 20 μL de cada poço que não apresentou crescimento visível em placas de Petri com meio de SDA, seguida de incubação a 36°C,



no escuro, sem agitação e durante 24h. Como controlo positivo, foram utilizados 20 µL das concentrações mais elevadas onde houve crescimento fúngico.



**Figura 65.** Exemplo de determinação da CML na decocção e no óleo de coptidis com *Candida krusei*.

### 3.7) Estudo factor de virulência da *Candida albicans*

#### 3.7.1) Ensaio da inibição da transição dimórfica

O ensaio da inibição do tubo germinativo foi efectuado de acordo com Lopes *et al* com pequenas alterações. As suspensões de *C. albicans* foram obtidas em meio de NYP (N-acetilglucosamina, base azotada para leveduras, prolina) a partir de culturas de 24h em meio de SDA. As suspensões foram ajustadas de forma a obter uma densidade de  $1,0 \pm 0,2 \times 10^6$  UFC/mL, determinada pela contagem das leveduras ( $100 \pm 20$  leveduras) na câmara de Neubauer.

Foram testados os óleos de coptidis e manuka e a decocção de coptidis, uma vez que foram as amostras em que se verificou actividade antifúngica nas concentrações testadas.

As diluições dos óleos/decocções foram preparadas em DMSO, sendo que a primeira concentração testada foi, no caso do óleo essencial e da decocção de *Coptidis chinensis* a CMI (10µL/mL) e no óleo essencial de manuka a CMI/2 (10µL/mL), e a última a CMI/4 (2,5µL/mL) e a CMI/256 (0,08µL/mL) respectivamente.

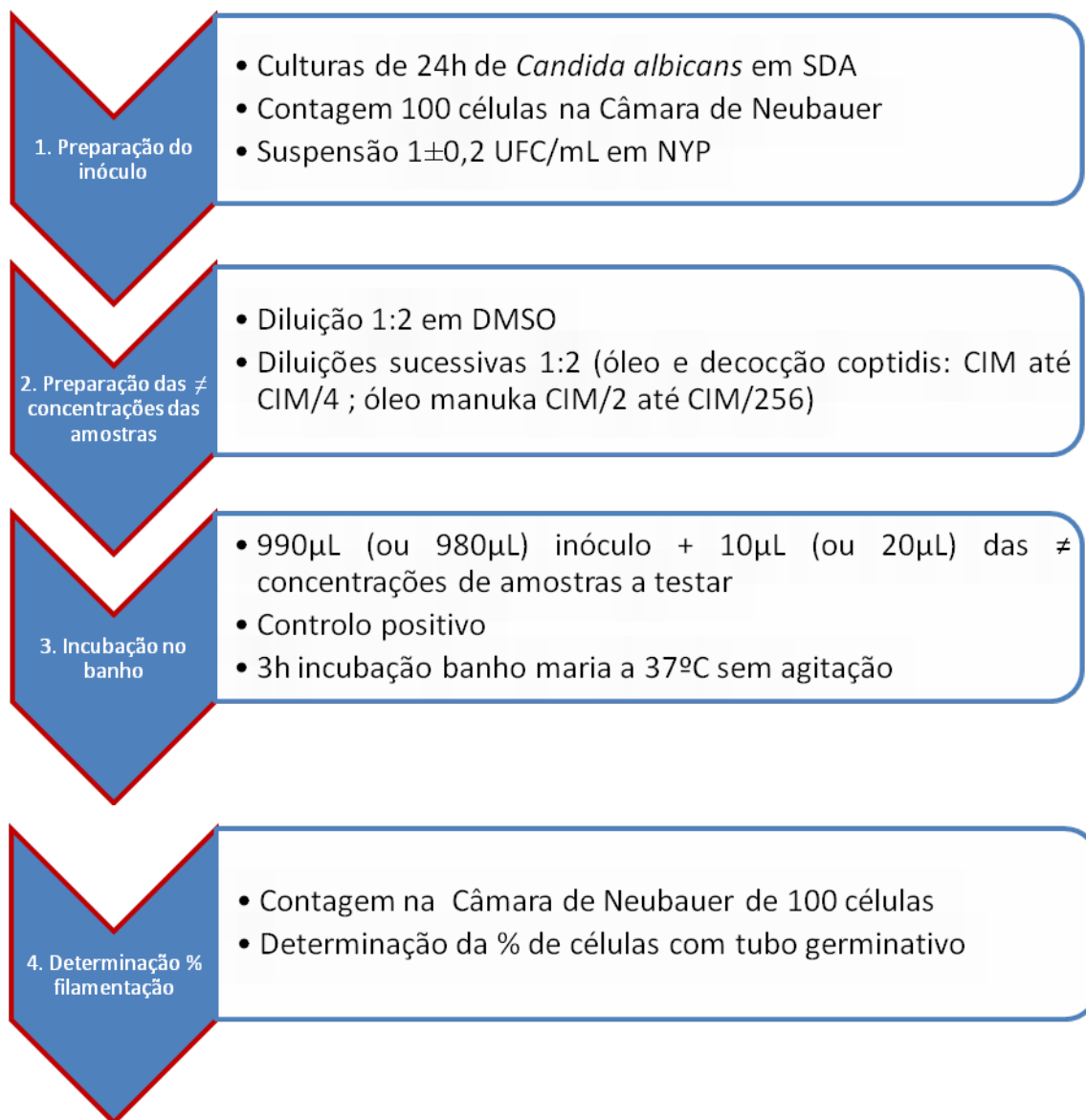
Em tubos de vidro com algodão foi feita a incubação de 980 ou 990µL de

---

suspensão de levedura com 20 ou 10µL das diferentes diluições de base 2 dos óleos essenciais e da decocção. Como controlo positivo, incluiu-se um tubo com a suspensão de levedura e o DMSO.

Depois de 3h de incubação em banho de água a 37°C, sem agitação, procedeu-se à determinação em Câmara de Neubauer, da percentagem de células com tubo germinativo para cada concentração de cada amostra e para o controlo através da contagem de 100 células. A presença de tubo germinativo foi considerada positiva, quando tinham pelo menos um comprimento igual ou superior ao diâmetro da célula-mãe e que não apresentassem uma constrição no ponto de conexão à mesma, característico das pseudo-hifas.

Este ensaio foi repetido quatro vezes para cada amostra.



**Figura 66.** Fluxograma do procedimento do ensaio da inibição da transição dimórfica.

---

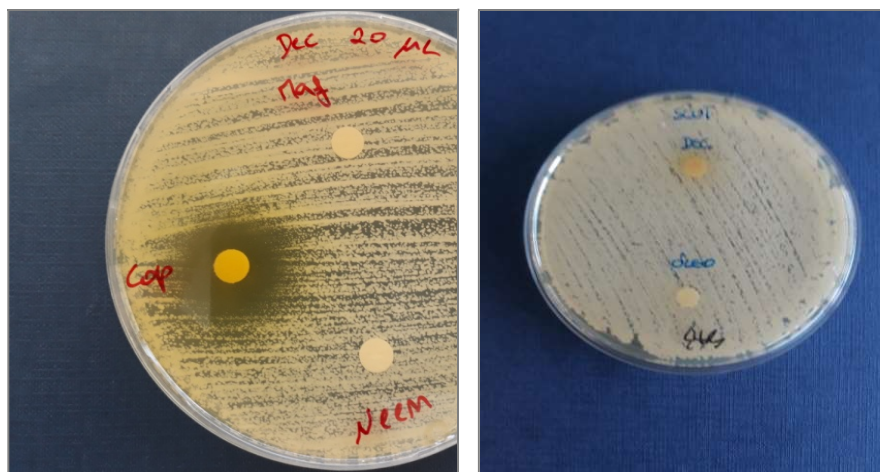
### **III. Resultados**

## 4.1) Avaliação da actividade antifúngica

### 4.1.1) Ensaio prévio de difusão em placa

Do ensaio prévio simplificado em placa foi possível ter uma ideia do comportamento antifúngico das amostras face à *Candida albicans*. As figuras 67 a 71 mostram os resultados obtidos. No que concerne às decocções, só a decocção de coptidis apresentou um halo de inibição considerável. As restantes decocções (magnólia, nim e escutelária) não tiveram qualquer influência no crescimento da levedura. Nos óleos essenciais o coptidis voltou a apresentar um halo de inibição, de diâmetro semelhante ao halo de inibição da decocção de coptidis, e o óleo de manuka um pequeno halo de inibição. Os restantes óleos, nim, magnólia e escutelária, não obtiveram resultados significativos.

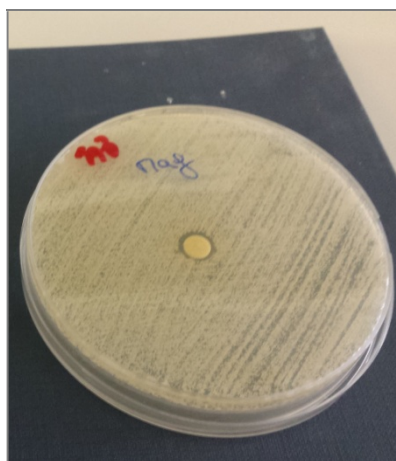
Este ensaio permitiu ajustar as concentrações a testar pelo micrométodo para determinação da actividade antifúngica em leveduras, sendo os resultados compatíveis entre eles.



**Figuras 67 e 68.** Da esquerda para a direita: Ensaio em placa das decocções de coptidis, magnólia e nim e ensaio em placa da decocção e óleo de escutelária.



**Figuras 69 e 70.** Da esquerda para a direita: ensaio em placa do óleo de coptidis e ensaio em placa dos óleos de manuka e nim.



**Figura 71.** Ensaio em placa do óleo de magnólia.

#### 4.1.2) Determinação da CMI e CML

Os resultados do efeito antifúngico, CMI e CML, das várias amostras de óleos essenciais e decocções sobre as estirpes de *Candida spp* são apresentados na Tabela 2.

Para a determinação da actividade antifúngica, considerou-se um único valor ou um intervalo de valores, no caso de ambiguidade de leitura, de CMI e CML.

Os óleos e a decocções das várias amostras (excepção da manuka cuja decocção não foi analisada por impossibilidade de obter a matéria-prima) apresentam valores iguais

---

de CMI e CML, com excepção da CML face à *Candida albicans* onde o óleo de coptidis (10-20µl/mL) tem valores mais elevados do que a respectiva decocção (5-10 µl/mL).

Pode verificar-se que os valores mais baixos de CMI e CML pertencem às amostras de coptidis, óleo e decocção, sendo as estirpes mais susceptíveis *Candida krusei* e *Candida tropicalis* (ambas com 0,6µl/mL). No coptidis verifica-se também que há uma acção fungicida na generalidade dos resultados, devido aos valores de CML obtidos, com excepção de *Candida glabrata* onde, apesar de haver alteração do crescimento e formação de microcolónias, não há um efeito fungicida nas concentrações testadas.

Seguidamente às amostras de coptidis, o óleo de manuka é o que apresenta melhores resultados: *Candida glabrata* é a estirpe mais sensível (10µl/mL) e *Candida parapsilosis* a menos afectada ( $\geq 20\mu\text{l/mL}$ ).

As decocções de magnólia, nim e escutelária assim como os respectivos óleos essenciais não apresentam actividade antifúngica em concentração igual ou inferior a 20µl/mL.

**Tabela 2.** Actividade antifúngica das amostras testadas em relação às estirpes de *Candida spp.* CMI e CML determinadas por micrométodo e expressas em µL/mL.

	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida glabrata</i>		<i>Candida krusei</i>		<i>Candida parapsilosis</i>		<i>Candida tropicalis</i>	
	<b>CMI</b>	<b>CML</b>	<b>CMI</b>	<b>CML</b>	<b>CMI</b>	<b>CML</b>	<b>CMI</b>	<b>CML</b>	<b>CMI</b>	<b>CML</b>
Decocção coptidis	5-10	5-10	5	>20*	0,6	0,6	2,5	2,5	0,6	1,25
Óleo coptidis	5-10	10-20	5	>20*	0,6	0,6	2,5	2,5	0,6	1,25
Óleo manuka	20	>20	10	>20	20	≥20	≥20	>20	20	>20
Decocção magnólia	>20		>20		>20		>20		>20	
Óleo magnólia	>20		>20		>20		>20		>20	
Decocção neem	>20		>20		>20		>20		>20	
Óleo neem	>20		>20		>20		>20		>20	
Decocção scutellaria	>20		>20		>20		>20		>20	
Óleo scutellaria	>20		>20		>20		>20		>20	

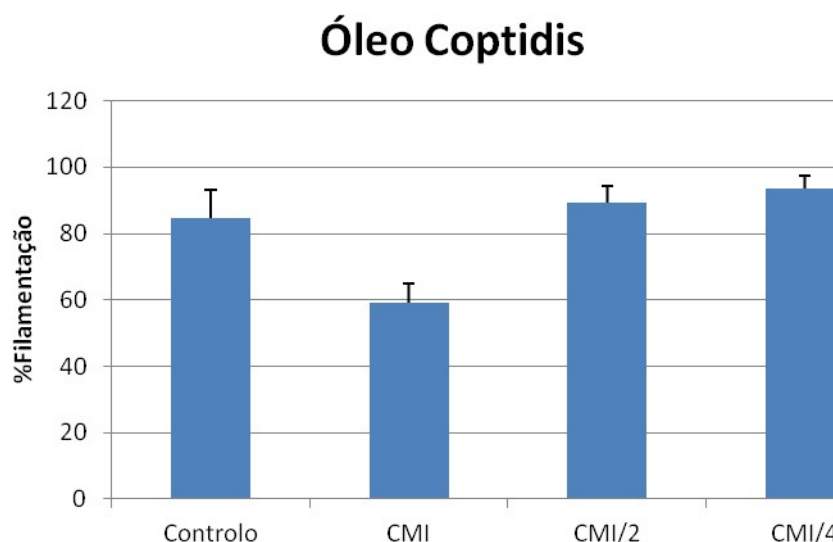
\*- afecta o tipo de crescimento, formação de microcolónias.



#### 4.1.3) Ensaio da inibição dimórfica

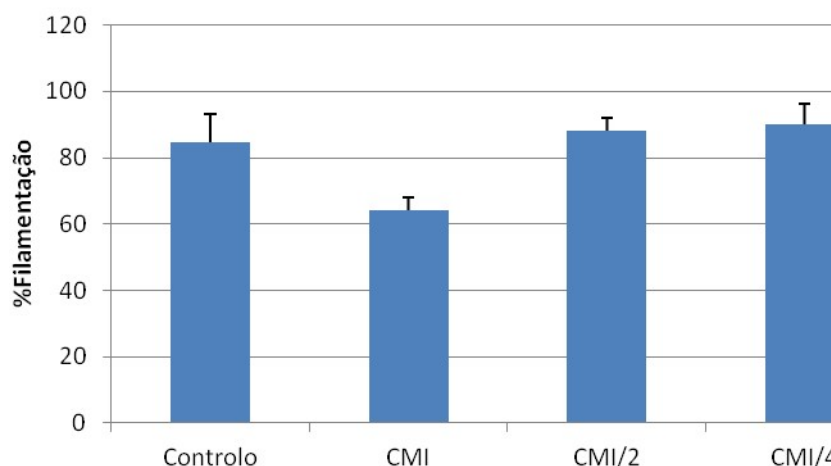
No género *Candida spp*, só *Candida albicans* tem a capacidade de efectuar uma transição dimórfica produzindo um tubo germinativo *in vivo* (Lopes, 2013). Por esse motivo, foi seleccionada a *Candida albicans* ATCC® 10231 para avaliar o efeito dos óleos essenciais de coptidis e manuka e da decocção de coptidis nessa transição dimórfica. O resultado dos efeitos na inibição da formação de tubos germinativos de *Candida albicans* ATCC®10231, quando tratada com os óleos essenciais de coptidis e manuka e com a decocção de coptidis, estão apresentados nas figuras 72 a 74.

No óleo e na decocção de coptidis, só a concentração correspondente à CMI (10µL/mL) possui algum efeito reduzindo em cerca de 40% a filamentação, sendo que as concentrações seguintes (CMI/2 e CMI/4) não têm qualquer influência neste processo.



**Figura 72.** Inibição da formação de tubos germinativos em *Candida albicans* ATCC® 10231 tratada com óleo essencial de coptidis. Resultados apresentados em valor absoluto médio ( $\pm$  desvio padrão) de tubos germinativos por 100 células em 4 ensaios.

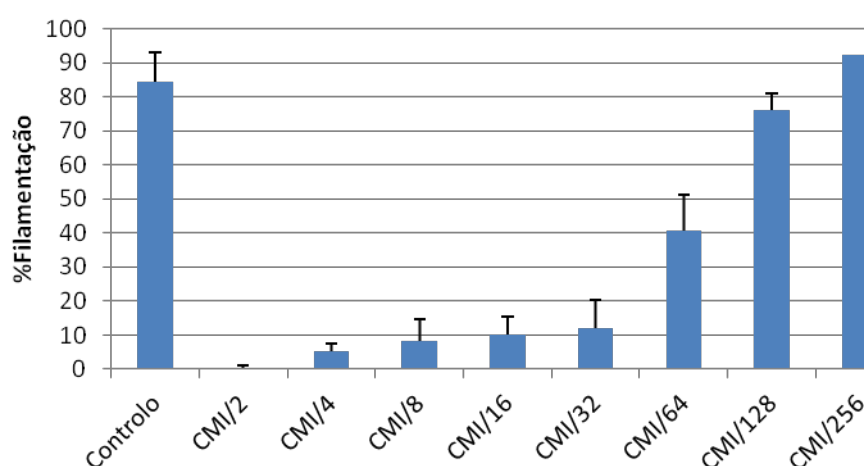
## Decocção Coptidis



**Figura 73.** Inibição da formação de tubos germinativos em *Candida albicans* ATCC® 10231 tratada com decocção de coptidis. Resultados apresentados em valor absoluto médio ( $\pm$  desvio padrão) de tubos germinativos por 100 células em 4 ensaios.

O óleo de manuka por sua vez inibe totalmente a formação do tubo germinativo até à concentração de 10 $\mu$ L/mL (CMI/2). Mantém valores próximos de 10% em concentrações subinibitórias até à concentração equivalente à CMI/32 (0,3125 $\mu$ L/mL) e a partir daí, a percentagem de filamentação aumenta gradualmente com a diminuição da concentração do óleo até à CMI/256.

## Óleo Manuka



**Figura 74.** Inibição da formação de tubos germinativos em *Candida albicans* ATCC® 10231 tratada com óleo essencial de manuka. Resultados apresentados em valor absoluto médio ( $\pm$  desvio padrão) de tubos germinativos por 100 células em 4 ensaios.

---

## **IV. Discussão**

---

Analisando os resultados obtidos neste estudo, verifica-se que a planta mais activa do ponto de vista da determinação da actividade antifúngica é o *rhizoma* coptidis, tanto em decocção como em óleo essencial.

Comparando os resultados do coptidis, pode-se verificar que os valores da CMI e da CML são na generalidade iguais para a decocção e para o óleo, o que permite deduzir que os compostos responsáveis pela actividade antifúngica são extraídos de forma semelhante, tanto pela ebulição na decocção como pela destilação por vapor de água efectuada na obtenção do óleo essencial. A única excepção é na CML em relação à *C. albicans* ATCC®10231 onde o óleo apresenta um resultado ligeiramente superior ao da decocção que pode ser justificado por uma possível variabilidade genética existente nos indivíduos da comunidade. O *rhizoma* coptidis possui uma actividade antimicrobiana de largo espectro e, apesar dos principais mecanismos antifúngicos ainda não estarem totalmente clarificados, pensa-se que poderão ser devidos à acção da berberina (Khodavandi, Tahzir et al. 2013).

Olhando para a sensibilidade das diferentes espécies de *Candida spp* ao coptidis, verifica-se que *C. krusei* é uma das espécies mais sensíveis, o que é interessante, uma vez que esta levedura é intrinsecamente resistente ao fluconazol e, assim, o coptidis poderá ser outra opção no tratamento. *C. albicans* ATCC®10231, por outro lado, é a menos sensível, talvez pela aquisição de alguns mecanismos de resistência, uma vez que é a espécie mais comum e frequentemente os pacientes são sujeitos a tratamentos de longa duração.

No *rhizoma* coptidis verifica-se também que, pela globalidade dos resultados, há uma acção fungicida, excepto em *C. glabrata*, onde os valores de CML obtidos são muito superiores aos da CMI, o que permite que esta planta possa ser utilizada isoladamente como antifúngico ou como adjuvante com um antifúngico convencional, por exemplo. Em *C. glabrata* há um efeito significativo na redução do tamanho das colónias devido à acção fungistática. Apesar da *C. albicans* ser a principal espécie envolvida em casos clínicos infecciosos, *C. glabrata* emergiu como uma causa frequente de infecções sanguíneas e das mucosas em muitos países, e apresenta uma baixa susceptibilidade ao fluconazol. Esta espécie é cerca de oito vezes mais resistente ao fluconazol que *C. albicans* e rapidamente desenvolve resistência em pacientes em terapia prolongada com este antifúngico (Khodavandi, Tahzir et al. 2013).

---

Analisando estudos publicados com o *rhizoma coptis*, é de salientar que são poucos os que utilizam extractos aquosos e muito menos os que testam a actividade antifúngica sob a forma de decocção ou óleo essencial. A maior parte dos trabalhos são efectuados com extractos alcoólicos, o que faz com que os compostos obtidos possam ser diferentes dos dos extractos aquosos (Nakamoto, Sadamori et al. 1990, Liu, Han et al. 2011, Kim, Yi et al. 2012, Khodavandi, Tahzir et al. 2013, Yang, Ning et al. 2015). O facto de este estudo expressar os resultados em  $\mu\text{L/mL}$ , pois os ensaios foram feitos directamente com as decocções e os óleos essenciais, não permite comparações quantitativas com estudos onde os extractos são evaporados e os resultados são depois apresentados em  $\mu\text{g/mL}$ . O que se pretendeu foi efectuar um estudo onde as amostras são testadas como se apresentam ao paciente, sem introdução de outros solventes para além do DMSO necessário para a solubilização dos óleos essenciais. Nos ensaios efectuados com extractos alcoólicos e nos efectuados com extractos aquosos, a maior parte testa só a actividade antifúngica em *C. albicans* (Franzblau and Cross 1986, Mekseepralard, Kamkaen et al. 2010) o que também limita as comparações noutras espécies.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os de Seneviratne *et al* no que concerne à acção antifúngica do *rhizoma coptis* em *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, mas divergem em *C. albicans* e em *C. parapsilosis* onde os autores referem que não há actividade antifúngica, contrariamente ao estudo de Franzblau *et al* onde se menciona uma forte actividade anti *C. albicans* (Franzblau and Cross 1986, Seneviratne, Wong et al. 2008). Note-se que as estirpes de *C. albicans* e *C. parapsilosis* são diferentes, pelo que a diferença de resultados pode justificar-se por esse facto. No estudo de Seneviratne *et al* foram utilizadas *C. albicans* ATCC®90028 e *C. parapsilosis* ATCC®22014 enquanto que neste estudo trabalhou-se com *C. albicans* ATCC®10231 e *C. parapsilosis* ATCC®22019.

Reflectindo no tipo de metodologia utilizada para determinar a CMI, há variabilidade nos métodos escolhidos: temos vários ensaios diferentes por difusão em disco (Franzblau and Cross 1986, Nakamoto, Sadamori et al. 1990, Blaszczyk, Krzyzanowska et al. 2000, Khodavandi, Tahzir et al. 2013), por macrodiluição em caldo (Mekseepralard, Kamkaen et al. 2010) e por microdiluição em caldo (Seneviratne, Wong et al. 2008, Yang, Ning et al. 2015), sendo a difusão em placa mais adequada para uma análise qualitativa e as diluições em caldo para a quantificação.

---

Até aos anos 90 não existia nenhum procedimento laboratorial estabelecido e por isso a reprodutibilidade dos resultados, métodos e interpretações entre laboratórios era baixa. Actualmente existe uma normalização dos procedimentos para a determinação da actividade antifúngica em leveduras, quer por difusão em placa quer por diluição em caldo, através do CLSI® e do EUCAST® (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), o que facilita a comparação entre estudos. Ambos os métodos apresentam reprodutibilidade, mas diferem entre si na quantidade do inóculo, meio e critérios para a definição da CMI (Lass-Flori, Perkhofer et al. 2010).

O óleo essencial de manuka foi a segunda amostra que apresentou mais actividade antifúngica apesar dos valores de CMI serem mais elevados dos que foram obtidos com o óleo e a decocção de coptidis. O óleo de manuka só não tem actividade em *C. parapsilosis* nas concentrações testadas. Verifica-se também que a acção é fungistática pois as CML são mais elevadas do que as CMI.

Comparando os ensaios de inibição dimórfica em *C. albicans*, verifica-se o coptidis e a manuka têm comportamentos distintos. Os resultados obtidos com o óleo essencial e a decocção de coptidis são bastante semelhantes entre si. Há alguma inibição da filamentação na concentração da CMI, mas em concentrações inferiores essa inibição deixa de ocorrer. No caso do óleo de manuka é clara a capacidade de inibição da filamentação em *C. albicans* e consequente aumento da virulência da estirpe, mesmo em concentrações bastante baixas. Este facto indica que pode ser utilizado como coadjuvante num tratamento antifúngico. Na pesquisa bibliográfica efectuada não foram encontrados estudos realizados com este tipo de ensaio quer no coptidis quer na manuka.

Os óleos essenciais aromáticos têm uma vasta aplicação na medicina tradicional e as suas propriedades já são conhecidas há vários séculos. No caso da manuka há vários estudos efectuados com o óleo essencial dos ramos e galhos, mas com resultados bastante contraditórios. Desta forma, temos estudos onde o óleo de manuka tem actividade antifúngica em *C. albicans* e *C. glabrata*, com CMI semelhantes às obtidas neste estudo (Schwiertz, Duttke et al. 2006), ou *C. tropicalis* com CMI mais elevadas (Chen, Yan et al. 2016), e outros onde o óleo de manuka é ineficaz em *C. albicans* em concentrações até 20µL/mL (Porter and Wilkins 1998, Christoph, Kaulfers et al. 2000, Van Vuuren, Docrat et al. 2014).

---

Fazendo um estudo comparativo mais aprofundado verifica-se que, em relação às estirpes de *C. albicans*, os trabalhos de Christoph *et al* e Van Vuuren *et al* não apresentaram actividade antifúngica comprovada. Os restantes estudos utilizaram estirpes ATCC® diferentes ou isolados clínicos e só o de Schwiertz *et al* teve uma CMI semelhante. Neste trabalho *C. glabrata* também proveio de um isolado clínico e teve a mesma concentração na CMI (10µL/mL). Já nos ensaios conduzidos por Chen *et al* com *C. tropicalis* a estirpe ATCC® foi diferente e a CMI obtida foi mais elevada do que 20µL/mL.

À semelhança do que ocorreu com o coptidis, temos também estudos com diferentes procedimentos: difusão em placa (Porter and Wilkins 1998), macrodiluição em caldo (Christoph, Kaulfers *et al.* 2000) e microdiluição em caldo (Schwiertz, Duttke *et al.* 2006, Van Vuuren, Docrat *et al.* 2014, Chen, Yan *et al.* 2016).

As divergências obtidas em estudos que utilizam a mesma estirpe provavelmente dever-se-ão à diferente composição química dos óleos essenciais de manuka que varia bastante consoante a sua origem geográfica tendo em conta que só na Nova Zelândia existem onze quimiotipos. E quando falamos de óleos essenciais de manuka provenientes de países como a África do Sul, a variabilidade quimiotípica ainda aumenta mais.

Na decocção das sementes de nim e no seu óleo essencial não foi obtida nenhuma acção antifúngica em *C. albicans*, o que é confirmado por outros estudos realizados anteriormente (Vaijayanthimala, Anandi *et al.* 2000, Devkatte, Zore *et al.* 2005, Agarwal, Lal *et al.* 2010, Dutta and Kundabala 2013, Padhye, Rai *et al.* 2013). Todos foram efectuados com isolados clínicos de *C. albicans* e pelo método de difusão em placa com excepção do estudo de Vaijayanthimala *et al* que foi realizado por macrodiluição em caldo. Apesar de serem estirpes de *C. albicans* distintas e métodos diferentes, a ausência de actividade antifúngica foi comum. Para as restantes espécies não foi encontrada informação na pesquisa bibliográfica.

Quanto à decocção e ao óleo essencial de *cortex magnolia* não foi obtida uma CMI nas concentrações testadas. Os principais componentes activos, o magnolol e o honokiol, são pouco solúveis em água o que pode explicar a falta de actividade em *C. albicans* num extracto aquoso (Chan, Cheah *et al.* 2008) ou numa decocção, como ocorreu neste estudo em relação aos extractos etanólicos onde foram obtidos resultados positivos (Nakamoto, Sadamori *et al.* 1990, Chan, Cheah *et al.* 2008). Saliente-se o facto

---

de também na bibliografia se encontrarem ensaios somente com magnolol e honokiol (Liu, Han et al. 2011) que demonstraram actividade antifúngica quer em *C. albicans* quer em *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (Liu, Han et al. 2011). Sun *et al* efectuaram ensaios de inibição dimórfica com magnolol e honokiol e provaram que estas moléculas bloqueiam o processo de filamentação. Desta forma pode-se deduzir que extractos etanólicos têm actividade antifúngica em várias espécies de *Candida* spp e que o magnolol e o honokiol são duas das moléculas responsáveis por essa acção, inibindo também o factor de virulência que constitui a passagem de levedura a hifa.

A *herbae scutellaria* não apresentou nenhuma actividade em nenhuma das *Candida* spp testadas, quer com a decocção quer com o óleo. Estudos com extractos aquosos ou decocções não foram encontrados; no entanto, um estudo com extracto alcoólico utilizando um isolado clínico de *C. albicans* num ensaio de difusão em placa também não teve resultado positivo (Zhang, Ravipati et al. 2013). Com o óleo essencial, este ensaio apresenta um resultado um pouco distinto de outro realizado também por microdiluição em caldo onde foi detectada uma fraca actividade antifúngica em *C. albicans* e *C. tropicalis* (Yu, Lei et al. 2004). Saliente-se, porém, que as duas espécies provinham de um isolado clínico, contrariamente às estirpes ATCC® que foram utilizadas neste trabalho.

Analisando globalmente os trabalhos publicados, verifica-se que há falta de coerência em muitos resultados o que se deve a vários factores, incluindo diferenças no método de extracção, nas estirpes de microorganismos utilizadas, na densidade e no tempo do inóculo fúngico, no tipo de testes antifúngicos efectuados e na pouca variabilidade de espécies estudadas. Tudo isto condiciona as análises e discussões de resultados entre estudos.



---

## **V. Conclusões e Perspectivas futuras**

---

Os benefícios de uma medicina integrativa são uma realidade incontornável. O conhecimento da fitoterapia chinesa e a de outras medicinas tradicionais é fundamental para a (re)descoberta de novos agentes terapêuticos. Os estudos nesta área de investigação são essenciais para justificar o uso tradicional e milenar de muitas plantas e para estabelecer uma parceria sólida, entre a medicina convencional e a não convencional, numa abordagem inovadora e complementar.

Este estudo é um pequeno passo no muito que há a fazer em investigação das plantas de uso tradicional e com ele concluiu-se que:

- o *rhizoma* coptidis, tanto em óleo essencial como em decocção, tem actividade antifúngica relevante em *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. albicans* (por ordem decrescente de impacto antifúngico) sendo fungicida em todas as espécies excepto em *C. glabrata*. No entanto, apesar de ter os melhores resultados em termos de actividade antifúngica, o coptidis não inibe a filamentação em *C. albicans*, um dos factores de virulência desta espécie;
- o óleo essencial de ramos e galhos manuka também tem actividade antifúngica, não tão significativa como o *rhizoma* coptidis, nas espécies *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. albicans*. Em *C. parapsilosis* não apresenta actividade antifúngica até 20 µL/mL. Tem um efeito inibidor forte na filamentação da *C. albicans*, pelo que pode ser utilizado como adjuvante com outros antifúngicos;
- as decocções e os óleos essenciais da casca da magnólia, das partes aéreas da escutelária e das sementes de nim não apresentaram actividade antifúngica nas concentrações testadas;
- a MTC é uma ciência actual e dinâmica que pode ser aplicada não só nas plantas já utilizadas em fitoterapia chinesa, mas também noutras, fazendo-se um estudo e análise das suas características;
- para além das decocções, formas utilizadas em MTC, os óleos essenciais têm um enorme potencial de uso na prática clínica e uma crescente evidência da sua actividade antimicrobiana.

Estes resultados são promissores e mais estudos *in vitro* serão necessários, nomeadamente no que concerne aos efeitos noutros factores de virulência de *Candida spp* como na formação de biofilmes, na produção de enzimas hidrolíticas, na adesão a células epiteliais, na interacção com macrófagos, etc. Do ponto de vista químico, era conveniente determinar a composição das amostras, especialmente no caso do óleo de manuka que apresenta elevada variabilidade, para ser possível esclarecer quais as

---

moléculas responsáveis pela actividade antifúngica e respectivos mecanismos de acção. Outros estudos importantes seriam os relacionados com o efeito destas plantas obtido em conjugação com antifúngicos convencionais. Dependendo dos resultados obtidos no conjunto destes testes, a realização de testes *in vivo* seria o passo seguinte.

---

## **VI. Bibliografia**

---

AEMFTC (2004). Farmacologia e Medicina Tradicionais Chinesas. São Paulo, ROCA.

Agarwal, V., P. Lal and V. Pruthi (2010). "Effect of Plant Oils on *Candida albicans*." Journal of Microbiology, Immunology and Infection 43(5): 447-451.

Alchemicabotanica. (2017). "Magnolia officinalis" Retrieved 01-07-2017, from <http://www.alchemicabotanica.com>.

Ashfaq Ahmed, M., R. Gayathri and V. Vishnupriya (2016). "Anti-fungal activity of neem oil." International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 39(1): 200-202.

Barbedo, L. and D. Sgarbi (2010). "Candidíase." J Bras Doenças Sex Transm 22(1): 22-38.

Biomerieux. (2017). "Automatic systems" Retrieved 05-07-2017, from <http://www.biomerieux-usa.com>.

Blaszczyk, T., J. Krzyzanowska and E. Lamer-Zarawska (2000). "Screening for antimycotic properties of 56 traditional Chinese drugs." Phytotherapy Research 14(3): 210-212.

Campos, E. V., J. L. de Oliveira, M. Pascoli, R. de Lima and L. F. Fraceto (2016). "Neem Oil and Crop Protection: From Now to the Future." Front Plant Sci 7: 1494.

CDC. (2014). "Centers for Disease Control and Prevention Fungal Diseases." Retrieved 12-07-2017, from <https://www.cdc.gov>.

Chan, L. W., E. L. C. Cheah, C. L. L. Saw, W. Weng and P. W. S. Heng (2008). "Antimicrobial and antioxidant activities of Cortex Magnoliae Officinalis and some other medicinal plants commonly used in South-East Asia." Chinese Medicine 3.

Chen, C. C., S. H. Yan, M. Y. Yen, P. F. Wu, W. T. Liao, T. S. Huang, Z. H. Wen and H. M. David Wang (2016). "Investigations of kanuka and manuka essential oils for in vitro treatment of disease and cellular inflammation caused by infectious microorganisms." J Microbiol Immunol Infect 49(1): 104-111.

---

Chen, S. C. and T. C. Sorrell (2007). "Antifungal agents." Med J Aust 187(7): 404-409.

Christoph, F., P. M. Kaulfers and E. Stahl-Biskup (2000). "A comparative study of the in vitro antimicrobial activity of tea tree oils s.l. with special reference to the activity of  $\beta$ -triketones." Planta medica 66(6): 556-560.

Chromagar (2009). "Our chromogenic media experience for your microbial testing" Retrieved 05-07-2017, from <http://www.chromagar.com>.

CLSI (2008a). M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 28.

CLSI (2008b). M27-S3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Third informational Supplement. 28.

Cuenca-Estrella, M. (2010). "[Antifungal agents in the treatment of systemic infections: Relevance of mechanism of action, activity profile and resistances]." Rev Esp Quimioter 23(4): 169-176.

Dermasinfo (2017). "Antifúngicos - fluconazol" Retrieved 01-07-2017 from <http://dermas.info>.

Doctortipster (2017). "Infecção vaginal por fungo candida ou candidíase." Retrieved 09-07-2017, from <http://www.doctortipster.com>

Devkotte, A. N., G. B. Zore and S. M. Karuppayil (2005). "Potential of plant oils as inhibitors of *Candida albicans* growth." FEMS Yeast Research 5(9): 867-873.

Dir.indiamart. (2017). "Azadirachta indica" Retrieved 02-07-2017, from <https://dir.indiamart.com>.

Dutta, A. and M. Kundabala (2013). "Antimicrobial efficacy of endodontic irrigants from *Azadirachta indica*: An in vitro study." Acta Odontol Scand 71(6): 1594-1598.

El-Hawary, S. S., M. E. El-Tantawy, M. A. Rabeh and W. K. Badr (2013). "Chemical composition and biological activities of essential oils of *azadirachta indica* a. juss." International Journal of Applied Research in Natural Products 6(4): 33-42.

---

Ferreira, W. F. C. and J. C. F. Sousa (2000). Microbiologia Volume 2. Lisboa, LIDEL.

Filippin, F. B. and L. C. Souza (2006). "Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B." Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas 42(2): 167-194.

Franzblau, S. G. and C. Cross (1986). "Comparative in vitro antimicrobial activity of chinese medicinal herbs" Journal of Ethnopharmacology 15(3): 279-288.

Goel, N., H. Rohilla, G. Singh and P. Punia (2016). "Antifungal Activity of Cinnamon Oil and Olive Oil against Candida Spp. Isolated from Blood Stream Infections." J Clin Diagn Res 10(8): 9-11.

Greten, H. J. (2007). Kursbuch Traditionelle Chinesische Medizin - TCM verstehen und richtig anwenden. Germany, Thieme.

Greten, H. J. (2013). Understanding TCM- The fundamentals of Chinese Medicine Part I. Heidelberg, Heidelberg School Editions.

Greten, H. J. (2015a). Understanding TCM- The fundamentals of Chinese Medicine Part II. Heidelberg, Heidelberg School Editions.

Greten, H. J. (2015b). Understanding Chinese Pharmacology -Scientific Chinese Medicine- The Heidelberg Model. Heildelberg, Heidelberg School Editions.

Greten, H. J. (2017). Comunicação oral. Porto, ICBAS.

Himratul-Aznita, W. H., C. O. Nor-Zulaila and K. Nurul-Fatihah (2016). "Antifungal activity of dual combination of hydroxychavicol with commercialized agents against oral Candida species." Springerplus 5(1): 1696.

Insetimax. (2014). "Azadiractina" Retrieved 02-07-2017, from <http://insetimax.com.br>.

Kareru, P. G., J. M. Keriko, G. M. Kenji, G. T. Thiong'o, A. N. Gachanja and H. N. Mukiira (2010). "Antimicrobial activities of skincare preparations from plant extracts." Afr J Tradit Complement Altern Med 7(3): 214-218.

---

Khodavandi, A., N. A. B. Tahzir, P. W. Cheng, P. Y. V. Chen, F. Alizadeh, N. S. Hrmal and C. P. Pei (2013). "Antifungal activity of Rhizome coptidis and Alpinia galangal against Candida species." Journal of Pure and Applied Microbiology 7(3): 1725-1730.

Kim, J. Y., Y. Yi and Y. Lim (2012). "Antifungal activity of coptidis rhizoma against Candida species." Journal of Medicinal Plants Research 6(12): 2295-2298.

Lass-Flörl, C., S. Perkhofer and A. Mayr (2010). "In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods." Mycoses 53(1): 1-11.

Leach, F. S. (2011). "Anti-microbial properties of Scutellaria baicalensis and Coptis chinensis, two traditional Chinese medicines." Bioscience Horizons 4(2): 119-127.

Lee, Y. J., Y. M. Lee, C. K. Lee, J. K. Jung, S. B. Han and J. T. Hong (2011). "Therapeutic applications of compounds in the Magnolia family." Pharmacology and Therapeutics 130(2): 157-176.

Li, R., L. Zhang, H. Zhang, Y. Yi, L. Wang, L. Chen and L. Zhang (2017). "Protective effect of a novel antifungal peptide derived from human chromogranin a on the immunity of mice infected with Candida krusei." Exp Ther Med 13(5): 2429-2434.

Life-worldwide. (2017). "Fungal diseases - Candida " Retrieved 01-07-2017, from <http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases>.

Lis-Balchin, M., S. Deans and S. Hart (1996). "Bioactivity of New Zealand medicinal plant essential oils." Acta Horticulturae 426: 13-30.

Lis-Balchin, M., S. L. Hart and S. G. Deans (2000). "Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils (Melaleuca alternifolia, Leptospermum scoparium or Manuka and Kunzea ericoides or Kanuka), originating in Australia and New Zealand." Phytotherapy Research 14(8): 623-629.

Liu, X., Y. Han, K. Peng, Y. Liu, J. Li and H. Liu (2011). "Effect of traditional Chinese medicinal herbs on Candida spp. from patients with HIV/AIDS." Advances in dental research 23(1): 56-60.



---

Lloyd, C. A. C., T. Menon and K. Umamaheshwari (2005). "Anticandidal activity of *Azadirachta indica*." Indian Journal of Pharmacology 37(6): 386-389.

Lopes, G., E. Pinto, P. B. Andrade and P. Valentao (2013) "Antifungal activity of phlorotannins against dermatophytes and yeasts: approaches to the mechanism of action and influence on *Candida albicans* virulence factor." PLoS One 8, e72203 DOI: 10.1371/journal.pone.0072203.

Maddocks-Jennings, W., J. M. Wilkinson, D. Shillington and H. Cavanagh (2005). "A fresh look at manuka and kanuka essential oils from New Zealand." International Journal of Aromatherapy 15(3): 141-146.

MDsaude. (2017). "Sapinho na boca - Candidíase oral." Retrieved 09-07-2017, from <http://www.mdsaude.com>.

Medicinanet. (2017). "Fotos de candidíase (imagens reais)" Retrieved 09-07-2017, from <http://www.medicinanet.com.br>.

Medicinescomplete. (2017). "Caspofungine" Retrieved 01-07-2017 from <https://www.medicinescomplete.com>.

Medsimples. (2017). "Candida albicans - simple" Retrieved 09-07-2017, from <http://medsimples.com>.

Mekseepralard, C., N. Kamkaen and J. M. Wilkinson (2010). "Antimicrobial and antioxidant activities of traditional Thai herbal remedies for aphthous ulcers." Phytother Res 24(10): 1514-1519.

Nakamoto, K., S. Sadamori and T. Hamada (1990). "Effects of crude drugs and berberine hydrochloride on the activities of fungi." The Journal of Prosthetic Dentistry 64(6): 691-694.

National analytical corporation. (2000). "Manual system" Retrieved 05-07-2017, from <http://www.nationalanalyticalcorp.com>

Oliveira, J. C. d. (2014). Tópicos em Micologia Médica I. Rio de Janeiro.

---

Padhye, S., S. Rai, N. Narula and S. Dekate (2013). "Screening of antifungal activity of some essential oils and antifungals on clinical fungal isolates from diabetic patients." Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences 4(2): 16-21.

Parente-Rocha, J. A., A. M. Bailao, A. C. Amaral, C. P. Taborda, J. D. Paccez, C. L. Borges and M. Pereira (2017). "Antifungal Resistance, Metabolic Routes as Drug Targets, and New Antifungal Agents: An Overview about Endemic Dimorphic Fungi." Mediators Inflamm 2017: 9870679.

Paulo, C., C. Mourao, P. M. Veiga, J. M. Marques, G. Rocha, A. F. Alves, A. Querol, A. A. Melico-Silvestre, I. Goncalves, O. Flores, C. Clemente and T. Goncalves (2009). "Retrospective analysis of clinical yeast isolates in a hospital in the centre of Portugal: spectrum and revision of the identification procedures." Med Mycol 47(8): 836-844.

Pharmazeutische-zeitung. (2017). "Voriconazol" Retrieved 01-07-2017 from <http://www.pharmazeutische-zeitung.de>

Poivre, M. and P. Duez (2017). "Biological activity and toxicity of the Chinese herb *Magnolia officinalis* Rehder & E. Wilson (Houpo) and its constituents." J Zhejiang Univ Sci B 18(3): 194-214.

Polaquini, S. R. B., T. I. E. Svidzinski, C. Kemmelmeier and A. Gasparetto (2006). "Effect of aqueous extract from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in composite resin by *Candida albicans*." Archives of Oral Biology 51(6): 482-490.

Porter, N. G. and A. L. Wilkins (1998). "Chemical, physical and antimicrobial properties of essential oils of *Leptospermum scoparium* and *Kunzea ericoides*." Phytochemistry 50(3): 407-415.

Rocha, F., R. Cardoso, V. China and J. Lopes (2011). A Epidemiologia da Candidíase VI Jornadas de Medicina Dentária da UCP, CRB. Viseu.

Rodrigues, C. F., S. Silva and M. Henriques (2014). "*Candida glabrata*: a review of its features and resistance." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 33(5): 673-688.

---

Sabino, R., C. Verissimo, J. Brandao, C. Martins, D. Alves, C. Pais and D. W. Denning (2017). "Serious fungal infections in Portugal." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 36(7): 1345-1352.

Schwartz, A., C. Duttke, J. Hild and H. J. Müller (2006). "In vitro activity of essential oils on microorganisms isolated from vaginal infections." International Journal of Aromatherapy 16(3-4): 169-174.

Seneviratne, C. J., R. W. Wong and L. P. Samaranayake (2008). "Potent anti-microbial activity of traditional Chinese medicine herbs against *Candida* species." Mycoses 51(1): 30-34.

Sun, L., K. Liao and D. Wang (2015). "Effects of magnolol and honokiol on adhesion, yeast-hyphal transition, and formation of biofilm by *Candida albicans*." PLoS One 10(2): e0117695.

Tan, H. L., K. G. Chan, P. Pusparajah, A. Duangjai, S. Saokaew, T. Mehmood Khan, L. H. Lee and B. H. Goh (2016). "Rhizoma Coptidis: A Potential Cardiovascular Protective Agent." Front Pharmacol 7: 362.

Tang, Q. L., A. R. Kang and C. X. Lu (2016). "Research article phytochemical analysis, antibacterial activity and mode of action of the methanolic extract of *Scutellaria barbata* against various clinically important bacterial pathogens." International Journal of Pharmacology 12(2): 116-125.

Tao, G. and M. J. Balunas (2016). "Current therapeutic role and medicinal potential of *Scutellaria barbata* in Traditional Chinese Medicine and Western research." Journal of Ethnopharmacology 182: 170-180.

Tcmwiki. (2017). " *Scutellaria barbata* " Retrieved 02-07-2017, from <https://tcmwiki.com>.

Tyagi, S., D. Sinha, P. Garg, U. Singh, C. Mishra and R. Nagpal (2013). "Comparison of antimicrobial efficacy of propolis, *Morinda citrifolia*, *Azadirachta indica* (Neem) and 5% sodium hypochlorite on *Candida albicans* biofilm formed on tooth substrate: An in-vitro study." Journal of Conservative Dentistry 16(6): 532-535.

---

Vaijayanthimala, J., C. Anandi, V. Udhaya and K. V. Pugalendi (2000). "Anticandidal activity of certain South Indian medicinal plants." Phytotherapy Research 14(3): 207-209.

Van Vuuren, S. F., Y. Docrat, G. P. P. Kamatou and A. M. Viljoen (2014). "Essential oil composition and antimicrobial interactions of understudied tea tree species." South African Journal of Botany 92: 7-14.

Wang, H., W. Mu, H. Shang, J. Lin and X. Lei (2014). "The antihyperglycemic effects of Rhizoma Coptidis and mechanism of actions: a review of systematic reviews and pharmacological research." Biomed Res Int 2014: 798093.

WHO (1999). WHO monographs on selected medicinal plants - I Volume. W. H. Organization. Geneva. 1: 105-114.

Wildhoneymanuka. (2017). "Manuka" Retrieved 02-07-2017, from <http://www.wildhoneymanuka.com>.

Winter, M. B., E. C. Salcedo, M. B. Lohse, N. Hartooni, M. Gulati, H. Sanchez, J. Takagi, B. Hube, D. R. Andes, A. D. Johnson, C. S. Craik and C. J. Nobile (2016). "Global Identification of Biofilm-Specific Proteolysis in *Candida albicans*." MBio 7(5).

Xiang, K. L., S. D. Wu, S. X. Yu, Y. Liu, F. Jabbour, A. S. Erst, L. Zhao, W. Wang and Z. D. Chen (2016). "The First Comprehensive Phylogeny of *Coptis* (Ranunculaceae) and Its Implications for Character Evolution and Classification." PLoS One 11(4): e0153127.

Yang, Y., Y. Ning, X. Zhu, R. Li, H. Ye, L. Zhao, L. Jin and X. Zhou (2015). "Antifungal and anti-inflammatory effects of coptidis rhizoma extract against *Candida Albicans*." African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 12(4): 161-168.

Yeastinfectioncause (2017). "*Candida albicans*" Retrieved 05-07-2017, from <http://yeastinfectioncause.net>

Yu, J., J. Lei, H. Yu, X. Cai and G. Zou (2004). "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria barbata*." Phytochemistry 65(7): 881-884.

Zhang, L., A. S. Ravipati, S. R. Koyyalamudi, S. C. Jeong, N. Reddy, J. Bartlett, P. T. Smith, M. de la Cruz, M. C. Monteiro, T. Melguizo, E. Jiménez and F. Vicente (2013).

---

"Anti-fungal and anti-bacterial activities of ethanol extracts of selected traditional Chinese medicinal herbs." Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 6(9): 673-681.